

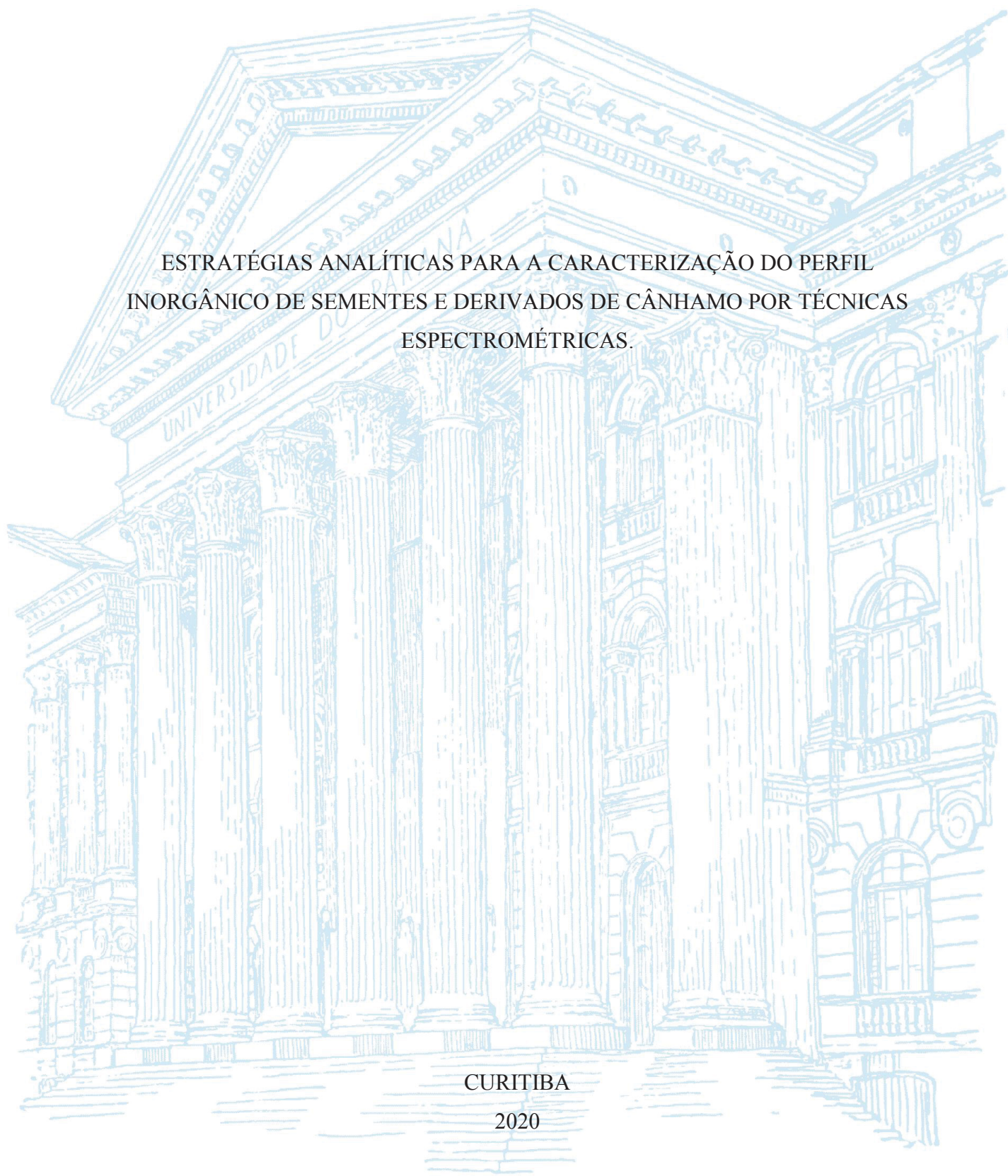
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IOHANNA MOREIRA NUNES RIBEIRO MENEZES

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
INORGÂNICO DE SEMENTES E DERIVADOS DE CÂNHAMO POR TÉCNICAS
ESPECTROMÉTRICAS.

CURITIBA

2020



IOHANNA MOREIRA NUNES RIBEIRO MENEZES

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
INORGÂNICO DE SEMENTES E DERIVADOS DE CÂNHAMO POR TÉCNICAS
ESPECTROMÉTRICAS.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Pinto de Oliveira.

CURITIBA

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

M543e

Menezes, Iohanna Moreira Nunes Ribeiro

Estratégias analíticas para a caracterização do perfil inorgânico de sementes e derivados de cânhamo por técnicas espectrométricas [recurso eletrônico]/ Iohanna Moreira Nunes Ribeiro Menezes, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Pinto de Oliveira.

1. Cânhamo. 2. Química. I. Oliveira, Andrea Pinto de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 540

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **IOHANNA MOREIRA NUNES RIBEIRO MENEZES** intitulada: **Estratégias analíticas para a caracterização do perfil inorgânico de sementes e derivados de cânhamo por técnicas espectrométricas**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Fevereiro de 2020.



ANDREA PINTO DE OLIVEIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



PATRICIO GUILLERMO PERALTA ZAMORA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MARIO HENRIQUE GONZALEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO/SJR. PRETO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e por ter me capacitado e me permitido alcançar lugares altos.

Agradeço à minha orientadora, professora Andrea Pinto de Oliveira, pela oportunidade, pelos incentivos quando as coisas pareciam que não iam acontecer, e principalmente pela confiança durante estes anos.

Agradeço a todos os professores que tiveram participação em todo meu processo de formação. Nesta etapa, destaco alguns professores que me auxiliaram de forma especial: Noemi, Marco Tadeu, Gilberto e Antônio Mangrich.

Agradeço aos amigos que fiz nessa jornada, Tassya, Juliana, Mayara G., Mayara F., Rita, Paulo, Priscila L., Priscila T., Juliano e Matheus; o caminho fica bem mais fácil quando é compartilhado.

Agradeço em especial à Patricia Andrade, que foi o grande presente que Deus me enviou nessa etapa. Agradeço por todo o carinho, pelas risadas, por compartilhar as dificuldades e as bonanças comigo, por tornar meus dias mais fáceis e fazer com que eu sinta que aqui é o meu lugar. Você é o agradecimento em comum que une profissional e pessoal. Obrigada por transformar a jornada no laboratório em um dia com uma amiga.

Agradeço ao meu marido, Victor, por – mesmo que não em silêncio – respeitar os momentos em que precisei me retirar para estudar, por estar ao meu lado, por me incentivar em todas as minhas escolhas, e por seu carinho quando precisei de conforto.

Agradeço aos meus pais, Adriana e Evandro, e minha irmã, Lavínia, por terem me incentivado e confiado em cada escolha que fiz até aqui. A saudade apertada todos os dias, mas o apoio e orgulho que vocês sentem de mim me impulsionam a continuar.

Agradeço a toda equipe do LISCOMP, do IFRJ – Campus Paracambi, que foi meu ponto de partida na pesquisa, por todo aprendizado e auxílio que dedicaram a mim durante o Ensino Médio e toda a Graduação, principalmente aos professores Renato, Valter e Douglas, que me orientaram por este período.

RESUMO

O cânhamo é uma das plantas mais completas para fins industriais e de consumo, devido ao fato de possuir várias características favoráveis, como sua composição rica em ácidos graxos e antioxidantes. Na indústria alimentícia, o principal produto do cânhamo é o óleo de semente, que contém um espectro completo de aminoácidos essenciais para a saúde humana, presença considerável de caroteno, elevada quantidade de minerais e principalmente elevada taxa de ácidos graxos essenciais, que constituem cerca de 80% do total de ácidos graxos presentes na semente. Apesar dos inúmeros benefícios do cânhamo na indústria, esta planta possui também um notável potencial fitorremediador, bem evidenciado na sua capacidade de acumulação de contaminantes inorgânicos, entre eles arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) nas raízes, folhas e sementes. Portanto, é relevante a preocupação com a proporção da aplicação do cânhamo na indústria alimentícia. Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento dos elementos químicos inorgânicos, bem como prover a avaliação do potencial tóxico das sementes de cânhamo e de seus derivados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo determinar a composição química inorgânica, bem como avaliar a toxicidade das amostras de sementes de cânhamo e seus derivados, empregando técnicas analíticas espectrométricas como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Dessa forma, nesse estudo a composição química inorgânica dos alimentos em estudo foi avaliada por meio de análise por ICP OES, o que evidenciou a presença dos seguintes constituintes inorgânicos: Macroelementos: Ca (10-2000 mg kg⁻¹), K (6500-14000 mg kg⁻¹), Mg (5-8000 mg kg⁻¹), P (39-17000 mg kg⁻¹); Microelementos: Al (15-68 mg kg⁻¹), Ba (0,1-11 mg kg⁻¹), Cr (0,3-1,9 mg kg⁻¹), Cu (10-24 mg kg⁻¹), Fe (92-168 mg kg⁻¹), Mn (0,7-152 mg kg⁻¹), Mo (0,03-1,3 mg kg⁻¹), Na (1,4-87 mg kg⁻¹), Pb (1,2-1,6 mg kg⁻¹) e Zn (51-96 mg kg⁻¹), todos abaixo dos limites máximos estabelecidos pelas agências reguladoras, FDA e ANVISA. Para a avaliação da toxicidade dos produtos de cânhamo por GF AAS em termos de seus constituintes inorgânicos, foram desenvolvidas estratégias de preparo de amostras e métodos analíticos para a determinação de As, Cd e Pb, avaliadas por meio de otimizações com planejamentos fatoriais. Tratamento ácido e solubilização alcalina foram empregados nessas análises. Limites de quantificação da ordem de 0,57 µg g⁻¹ (As), 0,036 µg g⁻¹ (Cd) e 0,38 µg g⁻¹ (Pb) foram obtidos, e valores satisfatórios de exatidão (recuperações de 87-100%) e precisão (RSD < 7%) foram alcançados para os analitos investigados. Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que as sementes de cânhamo com casca (SC1 e SC2) e sem casca (SD) contêm níveis de Pb (SC1 – 1,07 µg g⁻¹, SC2 – 1,23 µg g⁻¹ e SD – µg g⁻¹) acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA, Comunidade Europeia e FAO/WHO (0,2 µg g⁻¹). Em termos de teor de Cd (SC1 – 0,06 µg g⁻¹ e proteína de cânhamo (PR) – 0,07 µg g⁻¹) apresentaram teores abaixo dos limites recomendados pelas agências reguladoras (0,1 µg g⁻¹), enquanto para As não foi possível inferir no nível de segurança de consumo desses alimentos, uma vez que o LOQ do método (0,57 µg g⁻¹) estava um pouco acima dos limites preconizados pelas agências reguladoras (0,1-0,3 µg g⁻¹). Os métodos propostos mostraram-se robustos, com elevada precisão, exatidão e frequência analítica, alcançando os objetivos propostos.

Palavras-Chave: Cânhamo, solubilização alcalina, elementos inorgânicos, ICP OES, GF AAS.

ABSTRACT

Hemp is one of the most complete plants for industrial and consumer purposes, due to the fact that it has several favorable characteristics, as its composition is rich in fatty acids and antioxidants. In the Food Industry the main product of hemp is seed oil, which contains a full spectrum of essential amino acids for human health, considerable presence of carotene, high amount of minerals and especially the high rate of essential fatty acids, which constitute about 80% of the total fatty acids present in the seed. Despite the numerous benefits of hemp in the Industry, this plant also has a remarkable phytoremediation potential, well evidenced in its ability to accumulate inorganic contaminants, including arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) in roots, leaves and seeds. Therefore, the concern with the proportion of hemp application in Food Industry is relevant. Thus, it is important to develop analytical methods for monitoring inorganic chemical elements, as well as providing an assessment of the toxic potential of hemp seeds and their derivatives. Hence, this work aimed to trace the inorganic chemical composition, as well as to evaluate the toxicity of hemp seeds and their derivatives, using spectrometric analytical techniques such as Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES) and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GF AAS). Thus, in this study, the inorganic chemical composition of the foods under study was assessed by analysis by ICP OES, which evidenced the presence of the following inorganic constituents: Macroelements: Ca ($10\text{--}2000\text{ mg kg}^{-1}$), K ($6500\text{--}14000\text{ mg kg}^{-1}$), Mg ($5\text{--}8000\text{ mg kg}^{-1}$), P ($39\text{--}17000\text{ mg kg}^{-1}$); Microelements: Al ($15\text{--}68\text{ mg kg}^{-1}$), Ba ($0.1\text{--}11\text{ mg kg}^{-1}$), Cr ($0.3\text{--}1.9\text{ mg kg}^{-1}$), Cu ($10\text{--}24\text{ mg kg}^{-1}$), Fe ($92\text{--}168\text{ mg kg}^{-1}$), Mn ($0.7\text{--}152\text{ mg kg}^{-1}$), Mo ($0.03\text{--}1.3\text{ mg kg}^{-1}$), Na ($1.4\text{--}87\text{ mg kg}^{-1}$), Pb ($1.2\text{--}1.6\text{ mg kg}^{-1}$) and Zn ($51\text{--}96\text{ mg kg}^{-1}$), all below the maximum limits established by regulatory agencies, FDA and ANVISA. For the evaluation of the toxicity of hemp products by GF AAS in terms of their inorganic constituents, sample preparation strategies and analytical methods were developed for the determination of As, Cd and Pb, evaluated through optimizations with factorial designs. Acid treatment and alkaline solubilization were used in these analyzes. Quantification limits of the order of $0.57\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (As), $0.036\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (Cd) and $0.38\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (Pb) were obtained, and satisfactory values of accuracy (recoveries of 87-100 %) and precision ($\text{RSD} < 7\%$) were achieved for the investigated analytes. Based on the results of this study, it can be concluded that hemp seeds with shell (SC1 and SC2) and shelled (SD) contain Pb levels (SC1 - $1.07\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, SC2 - $1.23\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ and SD - $\mu\text{g g}^{-1}$) above maximum limit established by ANVISA, European Community and FAO/WHO ($0.2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$). In terms of Cd content (SC1 - $0.06\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ and hemp protein (PR) - $0.07\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), they presented levels below the limits recommended by regulatory agencies ($0.1\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), while for As it was not possible to infer the level of safe consumption of these foods, since the LOQ of the method ($0.57\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) was slightly above the limits recommended by regulatory agencies ($0.1\text{--}0.3\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$). The developed methods proved to be robust, with high precision, accuracy and analytical frequency, reaching the proposed objectives.

Keywords: Hemp, alkaline solubilization, inorganic elements, ICP OES, GF AAS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A- Ramo de <i>Cannabis</i> masculina florida. B- Ramo de <i>Cannabis</i> feminina florida.....	18
FIGURA 2 – Esquema de conversão do CBGA em THC e CBD.....	20
FIGURA 3 – Semente de cânhamo.....	22
FIGURA 4 – A- “Cacho” de flores masculinas. B- Aquênio (fruto composto por semente envolta pelo pericarpo) da planta feminina, cercado por brácteas (folhas). C- Aquênio sem brácteas. D- Semente nua.....	22
FIGURA 5 – Mecanismos que podem ocorrer na planta frente à presença dos contaminantes inorgânicos.....	25
FIGURA 6 – Esquema do sistema de introdução de amostras (nebulização) e da tocha de quartzo (atomizador) do ICP OES.....	28
FIGURA 7 – Esquema do sistema de atomização da técnica AAS em forno de grafite.....	29
FIGURA 8 – Representação das etapas do programa de aquecimento da técnica de GF AAS.....	30
FIGURA 9 – Sementes e derivados de cânhamo analisados neste trabalho.....	42
FIGURA 10 – Esquema dos procedimentos desenvolvidos com a amostra proteína de cânhamo.....	42
FIGURA 11 – Sementes SC1, SC2 e SD antes e após o processo de moagem, respectivamente.....	46
FIGURA 12 – Esquema de preparo da semente de cânhamo e derivados com tratamento ácido, obtido a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} com ponto central.....	49
FIGURA 13 – Esquema de preparo de amostras de semente de cânhamo e derivados por solubilização alcalina, empregando o reagente TMAH e radiação assistida por micro-ondas.....	50
FIGURA 14 – Gráficos de barras dos teores dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO_3 65% m v ⁻¹ , 2,00 mL de H_2O_2 30% v v ⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura, n = 3.....	59
FIGURA 15 – Avaliação nutricional dos alimentos em estudo. Porcentagem calculada em relação à porção de cada alimento tendo como base os valores recomendados de ingestão diária determinados pela ANVISA e FDA.....	64

FIGURA 16 – Curvas de pirólise e atomização para As, Cd e Pb. As análises foram desenvolvidas usando alíquotas de 20 µL de solução padrão de cada analito em meio ácido (HNO_3 1% v v ⁻¹), na presença de 5 µL de modificador químico (2,5 µg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$).....	66
FIGURA 17 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação da triagem das variáveis para a determinações de arsênio na amostra proteína de cânhamo por GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	70
FIGURA 18 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação nas determinações de arsênio na amostra proteína de cânhamo por GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	72
FIGURA 19 – Variação dos valores de SBR na avaliação da interação das temperaturas de pirólise e de atomização no planejamento fatorial completo 24 com ponto central aplicado para o elemento arsênio.....	73
FIGURA 20 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de arsênio no GF AAS.....	73
FIGURA 21 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação nas determinações de cádmio em meio de HNO_3 4 % v v ⁻¹ . Resposta monitorada: Recuperação (%).....	75
FIGURA 22 – Diagrama de médias previstas para a variável dependente (recuperação). O gráfico mostra a interação entre as variáveis temperaturas de pirólise e de atomização no planejamento para o cádmio.....	77
FIGURA 23 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de cádmio no GF AAS.....	77
FIGURA 24 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de chumbo no GF AAS.....	78
FIGURA 25 – Gráfico de Pareto para a variável dependente recuperação para a quantificação de As em sementes de cânhamo por GF AAS, em meio de TMAH. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	80
FIGURA 26 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de segunda ordem apresentados pelo planejamento fatorial completo 23 para otimização do preparo de amostras (solubilização alcalina) para determinação de As em proteína de cânhamo.....	81
FIGURA 27 – Tubo de grafite com aquecimento longitudinal com plataforma de L'vov integrada ao tubo de grafite.....	85
FIGURA 28 – Sinais transientes obtidos para os analitos As, Cd e Pb na avaliação do parâmetro SBR para os dois tipos de tubos utilizados. Soluções padrão em nível de 15 µg L ⁻¹ para As, Cd e Pb.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Misturas ácidas utilizadas para digestão de amostras de sementes e grãos.....	34
TABELA 2 – Misturas alcalinas utilizadas para solubilização de amostras de diversas matrizes.....	38
TABELA 3 – Condições reacionais empregadas na digestão das amostras de cânhamo e programa de aquecimento empregado no forno de micro-ondas. (Forno de micro-ondas modelo Multiwave Go, marca Anton Paar). Massa de amostra empregada: 300 mg.....	43
TABELA 4 – Condições instrumentais do ICP OES para a determinação dos elementos químicos nas amostras de estudo.....	44
TABELA 5 – Condições instrumentais para a determinação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e derivados por GF AAS.....	46
TABELA 6 – Condições experimentais para a otimização univariada das temperaturas de pirólise e de atomização para As, Cd e Pb. Volume de injeção de amostra: 20µL e 5µL de modificador, quando empregado.....	48
TABELA 7 – Programa de aquecimento empregado no Forno de Micro-ondas para solubilização das amostras de cânhamo em meio de TMAH. (Forno de micro-ondas modelo Multiwave Go, marca Anton Paar). Massa de amostra empregada: 10 mg.....	50
TABELA 8 – Avaliação da eficiência de digestão (avaliada em termos de exatidão e teor de carbono residual) de matrizes diversas.....	54
TABELA 9 – Teor de carbono residual (RCC) das sementes de cânhamo e seus derivados após a digestão ácida. (valor médio \pm sd, n = 3).....	54
TABELA 10 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos na determinação do teor de elementos inorgânicos em materiais de referência certificado. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=3.....	55
TABELA 11 – Limites de quantificação dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO ₃ 65% m v ⁻¹ , 2,00 mL de H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura.....	57
TABELA 12 – Teores dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO ₃ 65% m v ⁻¹ , 2,00 mL de H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura (valor médio \pm sd, n = 3).....	58

TABELA 13 – Avaliação nutricional dos alimentos em estudo. Porcentagem calculada em relação à porção de cada alimento, tendo como base os valores recomendados de ingestão diária.....	63
TABELA 14 – Planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} desenvolvido para a otimização do preparo de amostras e análise pelo GF AAS. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	68
TABELA 15 – Planilha do planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} desenvolvido para a otimização do preparo de amostras e análise pelo GF AAS. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	69
TABELA 16 – Planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central desenvolvido para a otimização do preparo de amostra associado ao tratamento térmico no GF AAS para determinação de arsênio. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	71
TABELA 17 – Planilha do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central desenvolvido para a otimização do preparo de amostra associado ao tratamento térmico no GF AAS para determinação de arsênio. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	71
TABELA 18 – Planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central aplicado para a otimização das condições instrumentais para a quantificação de Cd e Pb no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	74
TABELA 19 – Planilha do planejamento fatorial completo (2^3) com ponto central aplicado para a otimização das condições instrumentais para a quantificação de Cd no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	75
TABELA 20 – Programas de aquecimento desenvolvidos no GF AAS para determinação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e seus derivados.....	79
TABELA 21 – Planilha do planejamento fatorial completo (2^3) com ponto central aplicado para a otimização do preparo de amostra para a quantificação de As (solubilização alcalina) no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).....	79
TABELA 22 – Parâmetros das Curvas Analíticas de Calibração para quantificação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e seus derivados.....	83
TABELA 23 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos na determinação do teor de Cd e Pb em materiais de referência certificado. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=6.....	84
TABELA 24 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos por experimentos de adição e recuperação para a determinação de As, Cd e Pb em proteínas de cânhamo por GF AAS. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=6.....	84

TABELA 25 – Valores encontrados para os parâmetros SBR obtidos a partir das análises empregando tubo de grafite sem e com plataforma de L’vov para a quantificação dos analitos As, Cd e Pb em amostras de proteína de cânhamo e derivados por GF AAS.....86

TABELA 26 – Concentrações de As, Cd e Pb nas sementes de cânhamo e derivados, determinadas pelos métodos propostos por GF AAS (valor médio \pm sd, n = 3).....88

TABELA 27 – Comparação das concentrações de As, Cd e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes da planta Cannabis com os valores encontrados no presente estudo.....91

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (*National Health Surveillance Agency*)

BEC – Concentração Equivalente de Fundo (*Background Equivalent Concentration*)

CBD – Canabidiol (*Cannabidiol*)

CBD-A – ácido canabidiólico (*Cannabidiolic Acid*)

CBG-A – ácido canabigerólico (*Cannabigerolic Acid*)

CRM – Material de Referência Certificado (*Certified Reference Material*)

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

FDA – Administração de Comidas e Remédios (*Food and Drug Administration*)

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por forno de grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*)

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

INMETRO - Comunidade Europeia e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (*National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality*)

LOD – Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

LOQ – Limite de Quantificação (*Limit of Quantification*)

MA – Manteiga de cânhamo

OL – Óleo de cânhamo

PR – Proteína de Cânhamo

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SBR – Relação Sinal-Ruído (*Signal-to-Background Ratio*)

SC1 e SC2 – Sementes de cânhamo com casca

SD – Semente de cânhamo descascada

STPF – Forno de plataforma com temperatura estabilizada (*Stabilized Temperature Platform Furnace*)

THC – tetrahydrocannabinol (*Tetrahydrocannabinol*)

THC-A – ácido tetra-hidrocanabinólico (*Tetrahydrocannabinolic Acid*)

TMAH – Hidróxido de Tetrametilamônio (*Tetramethylammonium Hydroxide*)

SUMÁRIO

1 – Introdução	16
2 – Revisão Bibliográfica.....	18
2.1 – Potencial Bioacumulador do Cânhamo	23
2.2 – Técnicas Analíticas Espectrométricas	27
2.3 – Estratégias de Preparo de Amostras	33
3 – Objetivos.....	40
3.1 – Objetivo Geral	40
3.2 – Objetivos Específicos	40
4 – Materiais e Métodos	41
4.1 – Amostras, Reagentes, Soluções Padrão	41
4.2 – Estratégias de Preparo de Amostras	42
4.3 – Caracterização da Composição Química Inorgânica das Sementes de Cânhamo e seus Derivados por ICP OES.....	43
4.3.1 – Curvas Analíticas de Calibração (ANEXO 1)	44
4.3.2 – Teor de Carbono Residual (<i>Residual Carbon Content</i> - RCC)	44
4.3.3 – Estudo dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito).....	44
4.4 – Avaliação dos Elementos Potencialmente Tóxicos (As, Cd e Pb) nas Sementes de Cânhamo e seus Derivados por GF AAS.	45
4.4.1 – Processamento das Amostras de Sementes de Cânhamo	46
4.4.2 – Procedimento de otimização das condições instrumentais do GF AAS. ..	47
4.4.3 – Procedimento para o Tratamento ácido das amostras.	48
4.4.4 – Procedimento para a solubilização alcalina das amostras	49
4.4.5 – Estudo dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito).....	51
5 – Resultados e Discussão	52
5.1 – Estratégias de Preparo de Amostras para a quantificação dos analitos por ICP OES	52
5.2 – Determinação do teor de carbono residual (RCC)	53
5.3 – Validação dos métodos aplicados nas análises por ICP OES.....	55
5.4 – Tratamento Ácido para as Análises por GF AAS.....	65

5.5 – Emprego da Solubilização alcalina das sementes de cânhamo.....	79
5.6 – Validação dos Métodos Desenvolvidos no GFAAS	82
5.6.1 – Avaliação dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito)	82
5.6.2 – Avaliação da Sensibilidade do Método Proposto Empregando o Uso da Plataforma de L’vov nas Análises Químicas	85
5.6.3 – Quantificação dos analitos As, Cd e Pb nas sementes de cânhamo e seus derivados.....	88
 6 – Conclusões	 92
 Perspectivas Futuras	 93
 Referências	 94
 Anexo 1	 109
Anexo 2	113

1. Introdução

Existem dois termos principais de referência à *Cannabis*, sendo eles: maconha e cânhamo, que, apesar de remeterem à mesma espécie, fazem jus a duas plantas diferentes. O cânhamo é uma das plantas mais completas para fins industriais e de consumo, o que se deve ao fato de apresentar diversas características favoráveis, bem como: 1- a fibra da haste principal (caule) desta planta é altamente empregada em produção têxtil, produção de papel, cordas, plásticos, materiais de construção e biocombustível; 2- o óleo extraído da semente é rico em ácidos graxos e antioxidantes, de forma que este produto apresenta um alto valor nutricional para emprego na indústria alimentícia. A composição rica em ácidos graxos também possibilita a aplicação na indústria de cosméticos (produção de loções, cremes, xampus, hidratantes, maquiagens e afins) (JOHNSON, 2017; SMALL, 2016); 3- o óleo extraído das folhas, rico em canabinóides, permite seu uso cada vez mais abrangente na medicina, atuando como anti-inflamatório, antipsicótico, antiepilético, anticonvulsivo, neuroprotetor, analgésico, entre outros (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002).

Devido a significativa presença do cânhamo na indústria, a percepção da necessidade de cautela em sua utilização tem sido cada vez mais evidente. Além disso, estudos sugerem a utilização do cânhamo como eficiente bioacumulador e/ou fitorremediador, funcionando como um agente purificador de solos contaminados, por meio da absorção efetiva de contaminantes inorgânicos (ANGELOVA *et al.*, 2004; LOSER *et al.*, 2002; MIHOC *et al.*, 2013).

O acúmulo dos elementos químicos inorgânicos nos órgãos das plantas pode ocorrer por meio de processos de absorção, deposição física ou translocação. A absorção pode ocorrer diretamente pelas raízes e/ou folhas, enquanto a translocação é o processo geral de condução de espécies absorvidas pela raiz por toda a extensão da planta, chegando até as folhas e sementes. Muitos fatores podem influenciar na absorção dos elementos químicos pelas plantas, entre eles: diferenças na idade e fase do crescimento, variações sazonais, nível de contaminação, tipo de solo, pH, salinidade, tamanho do composto químico, entre outros (CARVALHO, 2009; SOARES *et al.*, 2001).

Uma vez explanados os benefícios e devido a sua tamanha versatilidade de utilização, estudos referentes à *Cannabis* vem crescendo continuamente nos últimos anos. Com o crescimento do interesse científico, as características e efeitos químicos dessa planta vêm sendo cada vez mais compreendidos empregando-se para esses propósitos métodos analíticos referentes à elucidação da composição orgânica, e, menos frequentemente,

composição inorgânica (JOHNSON, 2017; MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002; ZUARDI, 2006). Dado o notável potencial fitorremediador do cânhamo, bem evidenciado na sua capacidade de acumulação de contaminantes inorgânicos nas raízes, folhas e sementes, é objeto de estudo desse trabalho avaliar/quantificar os elementos químicos inorgânicos presentes nas sementes e alimentos derivados do cânhamo.

Em referência a necessidade biológica, os elementos químicos inorgânicos podem ser classificados como essenciais ou tóxicos ao organismo humano, bem como ao meio ambiente. Elementos essenciais são aqueles que, quando ausentes no organismo, geram anomalias funcionais ou estruturais, alguns exemplos são: Na, K, Mg e Zn. Elementos tóxicos, ou contaminantes inorgânicos, são aqueles que não são essenciais ao organismo, e que, quando presentes, podem causar alterações celulares, afetando órgãos e processos bioquímicos do organismo. Podem estar presentes no ambiente por fontes naturais (composição do solo, lixiviação de rochas), ou por fontes antrópicas (indústrias, mineração, agricultura). Exemplos destes contaminantes são: As, Cd e Pb (ANVISA, 2013; FISCHER *et al.*, 2017).

Desta forma, o presente trabalho tem como desafio analítico estabelecer um método para a quantificação dos contaminantes inorgânicos As, Cd e Pb nas sementes e derivados de cânhamo, empregando como estratégia de preparo de amostras as suspensões ácidas e/ou alcalinas dessas amostras que, em conjunto com as condições ótimas instrumentais de análise, viabilizem a quantificação desses analitos nas matrizes de estudo. A proposta desse trabalho foi, quando possível, não utilizar modificadores químicos, ou ainda empregar quantidades mínimas e necessárias do modificador, o que geralmente não é levado em consideração na maioria das análises por GF AAS, onde a presença do modificador em quantidades geralmente já padronizadas/consolidadas na literatura são utilizadas para as análises de diversos tipos de amostras.

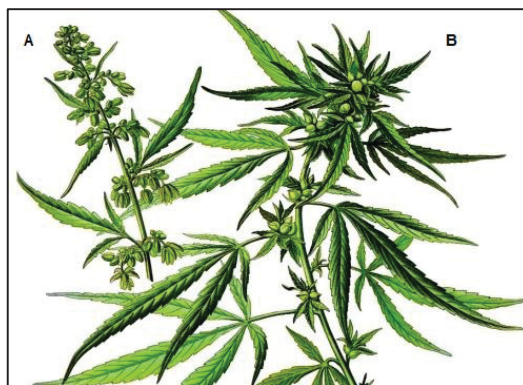
Sendo assim, utilizando apenas o corretor de fundo (*background*) do equipamento GF AAS (lâmpada de deutério), associado às condições ótimas de análise estudadas (tratamento de amostras e parâmetros instrumentais) e avaliando-se a real necessidade do emprego do modificador químico, estudou-se a possibilidade de quantificação desses analitos, explorando todas as potencialidades do GF AAS para o desenvolvimento dos métodos analíticos aqui propostos.

2. Revisão Bibliográfica

Cannabis sativa, comumente conhecida como maconha, é uma espécie de planta com uma enorme diversidade de funções, podendo atingir alturas de 1 a 5 metros. O tamanho varia de acordo com as condições ambientais e do solo, ou ainda a espécie da cannabis (SMALL, 2016).

A maior parte das plantas é considerada hermafrodita (monoica), apresentando elementos reprodutivos femininos e masculinos. Entretanto, a *Cannabis* está normalmente inserida em uma minoria denominada dioica - que não segue este padrão -, onde algumas plantas apresentam sistema reprodutor masculino, e outras, feminino (FIGURA 1) (CRIMALDI *et al.*, 2002; FRANCO & VIEGAS, 2017; PEART, 2018). Após o momento em que as plantas masculinas liberam o pólen para a fertilização, estas morrem, enquanto as femininas permanecem vivas durante o processo de polinização, maturação do fruto e liberação das sementes, morrendo após este processo. Por isso, as espécies de *Cannabis* são consideradas anuais, germinando, florescendo e morrendo. O período deste processo pode durar mais que 1 ano dependendo das condições ambientais fornecidas para o processo de maturação do fruto (SMALL, 2016).

FIGURA 1 – A- Ramo de *Cannabis* masculina florida. B- Ramo de *Cannabis* feminina florida.



FONTE: GIBELLI (2018)

De acordo com o Ministério das Relações Exteriores (1959), a *Cannabis* não é nativa do Brasil, tendo sido introduzida no país somente em 1549, trazida pelos escravos africanos. Neste tempo, seu uso dava-se principalmente para fins medicinais, mas seu potencial psicoativo foi disseminado entre negros e índios, que passaram a cultivar esta planta; não sendo este cultivo impedido por estar restringido principalmente entre as classes socioeconômicas menos favorecidas. Entretanto, por volta da década de 1930, devido a disseminação do conhecimento dos efeitos psicóticos causado pelo fumo da maconha, teve início a repressão do uso desta planta em todo o mundo, inclusive no Brasil. Sendo assim,

em 1938 foi oficialmente proibido seu uso, plantio, colheita e exploração particular (CARLINI, 2006).

Existem dois termos principais de referência à *Cannabis*, sendo eles: maconha e cânhamo, que, apesar de remeterem à mesma espécie, fazem jus a duas plantas diferentes. A maconha apresenta alto teor de substâncias psicoativas, sendo o tetra-hidrocanabinol - THC, o principal deles. O cânhamo não apresenta teor significativo de THC, sendo rico, entretanto, em substâncias com potencial terapêutico ao organismo humano, sendo o canabidiol – CBD, o principal deles (JOHNSON, 2017).

Portanto, para que a planta seja considerada maconha, o teor de THC deve ser bastante elevado, uma vez que a finalidade são os efeitos psicoativos, enquanto para ser considerada cânhamo, o teor de THC não pode ser superior a 0,3 %, quantidade determinada por lei, que garante a não ocorrência de efeito psicoativo (CITTI *et al.*, 2018).

A segregação entre plantas de maconha e cânhamo é possibilitada pelas técnicas de cultivo desta espécie. O controle das condições ambientais como temperatura, tipo de solo, luz e umidade, bem como a retirada da planta macho para evitar a polinização, ou manter a planta macho, possibilitando a polinização da fêmea, permite a diferenciação entre as variedades cânhamo ou maconha, uma vez que direciona o desenvolvimento da planta para crescimento de flores e folhas (maconha) ou frutos e sementes (cânhamo) (FRANCO & VIEGAS, 2017; JOHNSON, 2017).

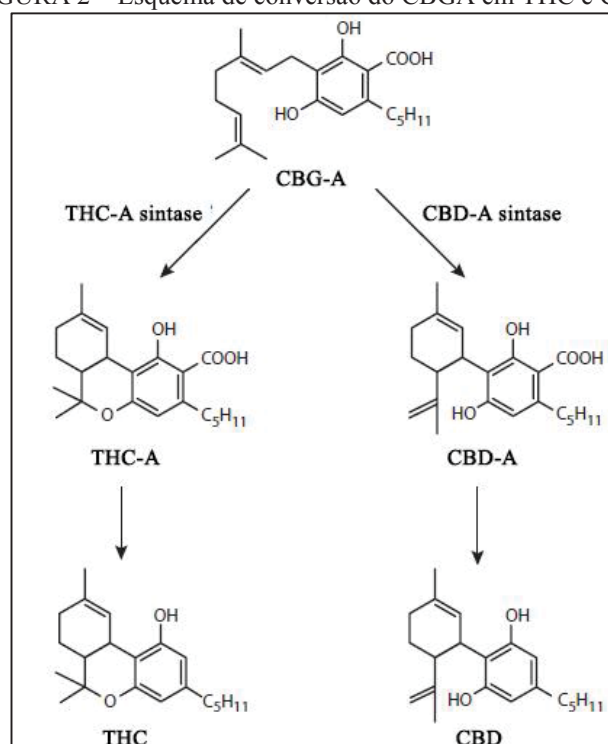
Além do desenvolvimento diferente, atingindo tamanho e tipo de folhagens divergentes, as principais diferenças entre essas duas variedades de plantas são os teores de THC e de CBD (PEART, 2018). O THC é altamente seletivo, e, por isso, pode modular poucos receptores no organismo humano, tendo poucos efeitos além do psicoativo. Contudo o CBD não apresenta efeito psicoativo, mas apresenta elevado potencial farmacológico, sendo considerado um fármaco multialvo, uma vez que não apresenta seletividade elevada, podendo assim se ligar a diferentes moduladores no organismo, tornando-se responsável por diversos benefícios de ação medicinal (FRANCO & VIEGAS, 2017; JOHNSON, 2017; MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002).

O THC e o CBD não são sintetizados diretamente pela planta, mas sim gerados a partir de processos sofridos pelo ácido canabigerólico (CBG-A) (HEMPMEDS BRASIL, 2018a; SMALL, 2016). O processo ocorre, resumidamente, da seguinte forma: a planta sintetiza naturalmente o CBG-A, que pode passar por diferentes processos (FIGURA 2), dependentes das condições ambientais.

O primeiro processo promove a produção de cânhamo, que ocorre quando a planta fêmea é polinizada. Neste caso, a decomposição do CBG-A favorece a formação de ácido canabidiólico (CBD-A), pela ação da enzima ‘CBD-A sintase’, uma vez que a energia da planta é direcionada para produção de sementes e frutos. Além disso, o CBD-A é precursor do CBD. Nesta reação enzimática, o ácido sofre decomposição, processo que ocorre naturalmente na planta em uma velocidade muito lenta, catalisada pelo calor, produzindo então o canabidiol (HEMPMEDS BRASIL, 2018a; SMALL, 2016). Assim, para fins de produção de cânhamo, plantas machos e fêmeas devem ser cultivadas juntamente, a fim de permitir a polinização. Estas plantas apresentam um bom desenvolvimento em ambientes naturais abertos, sem necessidade de controle de temperatura, luz e umidade (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002).

Já para fins de produção de maconha, o CBG-A é convertido, pela ação da enzima ‘THC-A sintase’, a ácido tetra-hidrocanabinólico (THC-A). Isso ocorre quando plantas macho são retiradas da área de cultivo durante o crescimento da *Cannabis*. Quando não existe fonte de polinização para as plantas fêmea, a energia dessas é direcionada principalmente para a produção de flores e folhas, aumentando a concentração de THC-A, precursor do THC, e que também passa por um processo de decomposição. Essas plantas se desenvolvem melhor em ambientes com temperatura, luz e umidade controladas (HEMPMEDS BRASIL, 2018a; MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002; SMALL, 2016).

FIGURA 2 – Esquema de conversão do CBGA em THC e CBD.



FONTE: Adaptado de SMALL (2016).

Como observado nesses mecanismos de síntese, conclui-se que quanto maior o teor de THC, menor é o teor de CBD na planta, e vice-versa (ZUARDI, 2008). Desta forma, considerando os fins de utilização, o cânhamo tem sua produção permitida e legalizada em aproximadamente 30 países espalhados pela Europa, Ásia, América do Sul e do Norte, enquanto a produção de maconha ainda é ilegal na maioria dos países (JOHNSON, 2017). A necessidade de produção de cânhamo é devida, principalmente, à produção de fibra, folhas e sementes. No Brasil o plantio do cânhamo ainda é proibido, somente uma empresa no país possui autorização para tal, que foi alcançada por meio de liminar concedida pela Justiça Federal. Atualmente a venda de medicamentos à base de CBD é permitida em farmácias e drogarias sem manipulação mediante prescrição médica. (CAMPOREZ, 2019; G1, 2019)

O cânhamo é uma das plantas mais completas para fins industriais e de consumo, o que se deve ao fato de apresentar diversas características favoráveis, bem como: 1- a fibra da haste principal (caule) desta planta é altamente empregada em produção têxtil, produção de papel, cordas, plásticos, materiais de construção e biocombustível; 2- o óleo extraído da semente é rico em ácidos graxos e antioxidantes, de forma que este produto apresenta um alto valor nutricional para emprego na indústria alimentícia. A composição rica em ácidos graxos também possibilita a aplicação na indústria de cosméticos (produção de loções, cremes, xampus, hidratantes, maquiagens e afins) (JOHNSON, 2017; SMALL, 2016); 3- o óleo extraído das folhas, rico em canabinóides, permite seu uso cada vez mais abrangente na medicina, atuando como anti-inflamatório, antipsicótico, antiepilético, anticonvulsivo, neuroprotetor, analgésico, entre outros (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002).

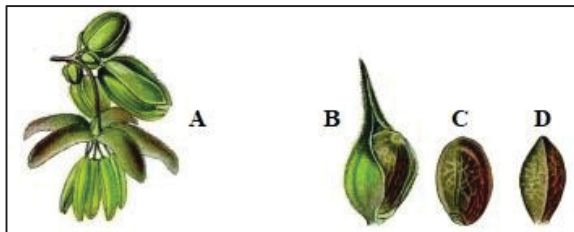
A semente de cânhamo (FIGURA 3), como é conhecida, é encontrada dentro do “fruto” da planta, que é designado na botânica como aquênio. O fruto é formado por uma única semente (preenchida pelo embrião) (MIHOC *et al.*, 2013; ZUARDI, 2006), envolta pelo pericarpo (membrana fibrosa que envolve a semente para fins de proteção) e brácteas (folhas) (FIGURA 4), e ficam localizadas juntamente ao caule da planta (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002). A semente apresenta considerável valor nutricional, sendo formada por 20-25 % de proteínas, 20-30 % carboidratos, 25-35 % de óleo (rico em ácidos graxos) e 10-15 % de fibra insolúvel e minerais (KORKMAZ *et al.*, 2010; OOMAH *et al.*, 2002). O tamanho da semente varia normalmente de 2-4 mm de diâmetro e 3-6 mm de comprimento (CALLAWAY, 2010; ZUARDI, 2006).

FIGURA 3 – Semente de cânhamo.



FONTE: HEMPMEDS BRASIL (2018b).

FIGURA 4 – A- “Cacho” de flores masculinas. B- Aquênio (fruto composto por semente envolta pelo pericarpo) da planta feminina, cercado por brácteas (folhas). C- Aquênio sem brácteas. D- Semente nua.



FONTE: SMALL (2016).

Na indústria alimentícia o principal produto do cânhamo é o óleo da semente, apresentando completo espectro de aminoácidos essenciais à saúde humana, presença considerável de caroteno (precursor da vitamina A), elevada quantidade de minerais (especialmente fósforo, potássio, magnésio, cálcio, ferro e zinco), e principalmente, elevada quantidade de ácidos graxos essenciais, que constituem cerca de 80 % do total de ácidos graxos presentes na semente, dentre os quais, ômega 3 e 6 (DEFERNE & PATE, 1996; KORKMAZ *et al.*, 2010).

Estudos relatam que os ácidos graxos poli-insaturados promovem melhorias marcantes na qualidade da pele, do cabelo e das unhas, além de reduzirem o colesterol e pressão arterial elevada. O óleo também apresenta elevada porcentagem de proteínas e antioxidantes, que previnem doenças, reduzem riscos de doenças cardiovasculares, e promovem a saúde (CALLAWAY, 2010; CITTI *et al.*, 2018; OOMAH *et al.*, 2002; PEART, 2018). A semente também pode ser consumida como farinha (triturada) ou ainda tostada. Já o óleo pode ser consumido como óleo de mesa em saladas e outros alimentos, ou como um substituto da margarina para mergulhar o pão, (semelhante em uso ao azeite de oliva), apresentando sabor parecido com amêndoas ou sementes de girassol, de leve amargor (CALLAWAY, 2010; CITTI *et al.*, 2018; DEFERNE & PATE, 1996; KORKMAZ *et al.*, 2010).

Na indústria de cosméticos o óleo de cânhamo também é altamente empregado devido a quantidade de ácidos graxos essenciais, uma vez que a pele os absorve prontamente, reparando células danificadas pela irradiação solar. Os ácidos graxos presentes no óleo são absorvidos via circulação sanguínea em casos onde a pele se encontra altamente danificada,

sendo então metabolizados, e possibilitando sua cicatrização, apresentando assim, potencial emprego para o tratamento de dermatites (DITRÓI *et al.*, 2013; KOWALSKA, ZIOMEK & ZBIKOWSKA, 2015).

Com a melhoria e modernidade das técnicas analíticas empregadas nas pesquisas científicas atualmente, as características e efeitos da planta *Cannabis* estão sendo cada vez melhor compreendidos por meio de métodos analíticos de adequada exatidão e precisão (GALIC *et al.*, 2019; MIHOC *et al.*, 2012; TIWARI *et al.*, 2014; ZEHRA *et al.*, 2009; ZERIHUN *et al.*, 2015). Assim, devido a significativa presença do cânhamo na indústria, a percepção da necessidade de cautela em sua utilização tem sido cada vez mais evidente. Além disso, estudos sugerem a utilização do cânhamo como eficiente bioacumulador e/ou fitorremediador, funcionando como um agente purificador de solos contaminados, por meio da absorção efetiva de contaminantes inorgânicos (ANGELOVA *et al.*, 2004; LOSER *et al.*, 2002; MIHOC *et al.*, 2013).

2.1. Potencial Bioacumulador do Cânhamo

Em referência a necessidade biológica, os elementos químicos inorgânicos podem ser classificados como essenciais ou tóxicos ao organismo humano, bem como ao meio ambiente. Elementos essenciais são aqueles que, quando ausentes no organismo, geram anomalias funcionais ou estruturais, alguns exemplos são: Na, K, Mg e Zn. Elementos tóxicos, ou contaminantes inorgânicos, são aqueles que não são essenciais ao organismo, e que, quando presentes, podem causar alterações celulares, afetando órgãos e processos bioquímicos do organismo. Podem estar presentes no ambiente por fontes naturais (composição do solo, lixiviação de rochas), ou por fontes antrópicas (indústrias, mineração, agricultura), exemplos destes contaminantes são: As, Cd e Pb (ANVISA, 2013; FISCHER *et al.*, 2017).

A principal forma de contaminação por arsênio (As) é pelo consumo de água contaminada, podendo ser absorvido pelo trato gastrointestinal. A exposição ao arsênio pode gerar febre; conjuntivite; hiperpigmentação da pele; doenças cardiovasculares; distúrbios no sistema nervoso central e vascular; câncer de pele, feridas na pele e gangrena. A exposição crônica ao arsênio pode gerar ainda anorexia, falência do fígado, câncer no pulmão, próstata, bexiga, fígado e rins; e, em casos extremos, falência cardíaca (EFSA, 2009; BARRA *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2017).

O cádmio (Cd) também é bioacumulativo, sendo encontrado no organismo principalmente em células sanguíneas, ligado a proteínas plasmáticas. Interfere nos sistemas

dependentes do cálcio, devido à semelhança destes íons, causando osteoporose e atrofia; tem elevado potencial carcinogênico, causando principalmente câncer nos rins, fígado, estômago e próstata; hipertensão, causando problemas cardiovasculares; catarata; atrofia muscular; alterações cognitivas, psicomotoras e na memória; edemas pulmonares; entre outros efeitos indesejáveis (EFSA, 2012a; FERNANDES & MAINIER, 2014; FISCHER *et al.*, 2017).

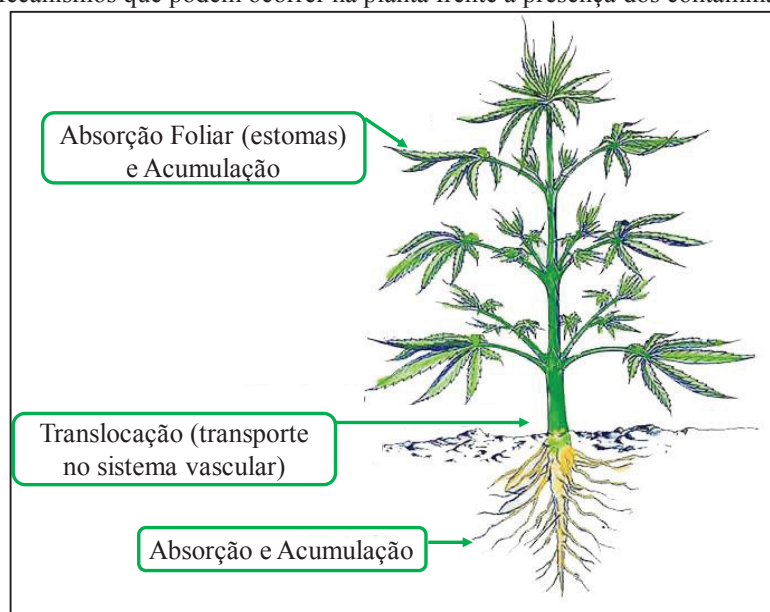
O chumbo (Pb) é um metal altamente tóxico, que pode ser acumulado em todos os órgãos e sistemas do organismo, podendo interagir com proteínas e imitar ou inibir a ação do cálcio. Além disso, altera o funcionamento de membranas celulares e enzimas, por meio de formação de complexos estáveis com grupamentos doadores de elétrons, resultando em efeitos tóxicos, principalmente ao sistema nervoso, medula óssea e rins. Entre os efeitos no organismo, provoca alterações renais (redução gradual e irreversível da função renal); hipertensão, levando a problemas cardiovasculares; alterações no sangue (anemia, independente ou não da ausência de ferro); efeito carcinogênico; abortivo; redução do crescimento (estatura); efeitos gastrintestinais; hepáticos; e no desenvolvimento cerebral (encefalopatia), podendo levar a invalidez e outros efeitos indesejáveis (EFSA, 2012b; FISCHER *et al.*, 2017; MOREIRA & MOREIRA, 2004).

Desta forma, a presença de tais elementos em alimentos promove efeitos prejudiciais à saúde humana, sendo, portanto, controlados em produtos industriais pelas agências regulamentadoras, como a Food and Drug Administration (FDA), European Food Safety Authority (EFSA) e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Como já é conhecido, quanto maior o índice de consumo de alimentos produzidos a partir de plantas com potencial bioacumulador, maiores são as probabilidades de incidência de reações adversas na população (FISCHER *et al.*, 2017).

O cânhamo é considerado uma planta resistente, que se desenvolve em ambientes poluídos e com presença de contaminantes inorgânicos (JOHNSON, 2017). O acúmulo dos elementos químicos inorgânicos nos órgãos das plantas pode ocorrer por meio de processos de absorção, deposição física ou translocação. A absorção ocorre diretamente pelas raízes e/ou folhas, enquanto a translocação é o processo geral de condução de espécies absorvidas pela raiz por toda a extensão da planta, chegando até as folhas e sementes (FIGURA 5). Muitos fatores podem influenciar na absorção dos elementos químicos pelas plantas, entre eles: diferenças na idade e fase do crescimento, variações sazonais, nível de contaminação, tipo de solo, pH, salinidade, tamanho do composto químico, entre outros (CARVALHO, 2009; SOARES *et al.*, 2001).

A tolerância aos contaminantes está associada à capacidade de certas plantas restringirem o metal à parede celular e ativar o sistema de defesa antioxidante, sendo que esse sistema de defesa está dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático é composto principalmente pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), enquanto o sistema não-enzimático é composto por substâncias antioxidantes, como vitaminas (A, C e E), minerais e compostos fenólicos, de origem endógena ou dietética. Ambos os sistemas têm a função de inibir ou reduzir os danos causados por espécies químicas reativas, podendo essas ser radicais ou não. O acúmulo de metais tóxicos catalisa reações de formação de radicais livres, que são os causadores dos problemas associados ao desenvolvimento da planta, assim, em plantas fitorremediadoras, os sistemas de defesa são ativados, impedindo e/ou controlando a formação desses radicais, de forma que a planta se torna resistente à presença do contaminante (ALVES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; SHARMA & DUBEY, 2005; SILVA, SANTOS & GUILHERME, 2015).

FIGURA 5 – Mecanismos que podem ocorrer na planta frente à presença dos contaminantes inorgânicos.



FONTE: Adaptado de ANGELOVA *et al.* (2004).

Algumas espécies de plantas apresentam adaptações fisiológicas nas folhas, tornando-as capazes de tolerar elevada salinidade, ocorrendo assim quantidades consideráveis de sais inorgânicos nas folhas. MacFarlane & Burchet (2000) demonstraram a capacidade das plantas fitorremediadoras de acumular elementos inorgânicos. Outro meio de contaminação bastante eficiente ocorre por meio da absorção desses contaminantes pelos estomas das folhas, o que é amplamente documentado na literatura, sendo, nesse caso, a

poluição atmosférica a principal fonte responsável de contaminação (RANGEL *et al.*, 2006; SILVA, VITTI & TREVIZAM, 2007).

Quanto menor o raio iônico, maior será a facilidade de penetração e translocação do íon ao longo da planta. Neste sentido, o chumbo (Pb), por exemplo, permanece parcialmente retido na superfície das folhas e raízes, enquanto elementos de menor raio iônico, como cádmio (Cd) e arsênio (As) são facilmente transportados por toda a planta (RANGEL *et al.*, 2006; SILVA, VITTI & TREVIZAM, 2007).

Linger *et al* (2002), Rangel *et al* (2006) e Silva, Vitti & Trevizam (2007) analisaram grãos, folhas, raízes e fibras de diversas plantas. Os estudos indicaram que, em geral, a acumulação dos elementos químicos ocorre principalmente nas raízes e folhas. Entretanto, suas concentrações variam consideravelmente de acordo com os fatores de absorção/translocação supracitados, sendo observados teores de contaminantes inorgânicos também em sementes. Desta forma, pode ocorrer a inserção destes elementos indesejáveis, tais como As, Cd e Pb na cadeia alimentar, oferecendo riscos à saúde humana.

O solo contém naturalmente pequenas quantidades de contaminantes inorgânicos em sua composição. Contudo, o teor desses contaminantes pode ser significativamente elevado devido às emissões de gases veiculares e industriais, fertilizantes agrícolas geralmente contaminados com As, Cd e Pb, como também por indústrias de produção de metais entre outras fontes antrópicas (KORKMAZ *et al.*, 2010). Em alguns estudos são relatados que, devido a elevada contaminação do solo e da atmosfera, quanto maior a proximidade da planta com a fonte de poluição, maior será a concentração dos contaminantes nelas presentes. Em resumo, a concentração dos poluentes absorvidos pelas plantas é diretamente proporcional à contaminação ambiental a qual a planta está inserida. Com isso, o cânhamo pode ser considerado como um potencial removedor de substâncias inorgânicas, promovendo a limpeza do solo por meio da absorção efetiva das substâncias presentes neste (ANGELOVA *et al.*, 2004; LINGER *et al.*, 2002; MIHOC *et al.*, 2013).

Contudo, dada a elevada aplicabilidade nutricional/comercial da semente e do óleo extraído da semente de cânhamo, estes vêm sendo bastante empregados em diversos setores da indústria alimentícia em nível mundial. Uma vez explanados todos os benefícios e devido a sua tamanha versatilidade de utilização, estudos referentes à *Cannabis* vem crescendo continuamente nos últimos anos. Com o crescimento do interesse científico, as características e efeitos químicos dessa planta vêm sendo cada vez mais compreendidos empregando-se para esses propósitos métodos analíticos referentes à elucidação da

composição orgânica, e, menos frequentemente, composição inorgânica (JOHNSON, 2017; MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002; ZUARDI, 2006).

Como consequência do melhor conhecimento/entendimento químico do universo científico referente à *Cannabis*, é relevante a preocupação com a proporção da aplicação do cânhamo na indústria, principalmente nos setores alimentício e de cosméticos. Dado o notável potencial fitorremediador do cânhamo, bem evidenciado na sua capacidade de acumulação de contaminantes inorgânicos nas raízes, folhas e sementes, é objeto de estudo desse trabalho avaliar/quantificar os elementos químicos inorgânicos presentes nas sementes e alimentos derivados do cânhamo.

Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento dos elementos químicos inorgânicos, bem como prover a avaliação do potencial tóxico das sementes de cânhamo e de seus derivados. Vale salientar que atualmente o perfil químico orgânico desta matriz vem sendo bem elucidado na literatura (CITTI *et al.*, 2019; FATHORDOOBADY *et al.*, 2019; GUMUSKAYA, USTA & BALABAN, 2019; KOJOMA *et al.*, 2006; KRIESE *et al.*, 2004; RUSTICHELLI *et al.*, 1998; ZOLLER, RHYN & ZIMMERLI, 2000), bem como seus benefícios à saúde humana. Entretanto, verifica-se que a caracterização química inorgânica dessas amostras ainda é muito pouco explorada, evidenciando a importância em traçar o perfil químico inorgânico da semente de cânhamo e seus derivados, bem como avaliar sua potencial toxicidade frente ao organismo humano, levando-se em consideração o potencial fitorremediador da *Cannabis*.

2.2. Técnicas Analíticas Espectrométricas

Estratégias de preparo de amostras foram investigadas levando-se em consideração o método de determinação empregado. A fim de se avaliar os constituintes inorgânicos presentes na matriz de análise, técnicas espectrométricas foram empregadas, como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry* - ICP OES) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* - GF AAS). Essas técnicas analíticas apresentam fundamentos químicos e nível de detectabilidade distintos sendo empregadas de acordo com o teor do(s) analito(s) presente na matriz, bem como a capacidade de detectabilidade intrínseca a cada técnica analítica.

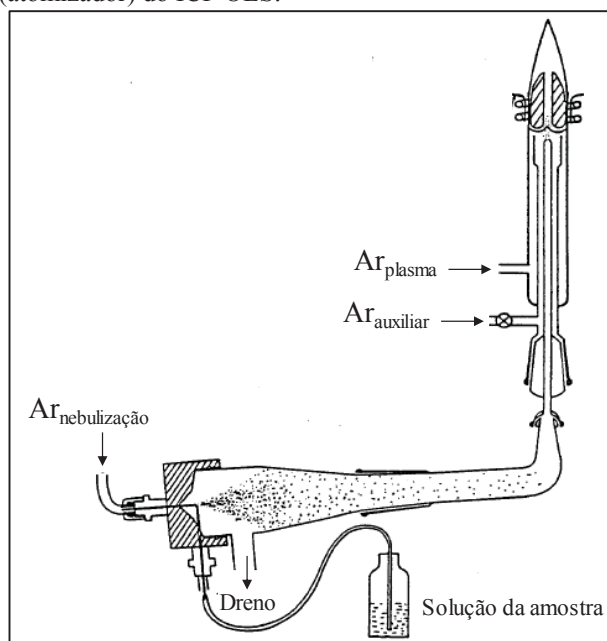
O ICP OES baseia-se na detecção da emissão de radiação eletromagnética quando átomos são submetidos a variações de energia térmica. Nesse caso, a ionização dos

elementos químicos ocorre em um plasma de um gás inerte, formado dentro de uma tocha de quartzo, onde a temperatura pode variar entre 5000 a 10000K (SKOOG *et al.*, 2006).

Os elementos presentes na amostra são excitados pelo plasma, e, posteriormente, liberam energia, retornando ao estado fundamental. Esta radiação liberada pelo átomo é detectada e quantificada, sendo possível determinar a concentração do(s) analito(s) na amostra. A radiação proveniente do decaimento de múltiplos elementos é policromática, sendo assim, os monocromadores selecionam os comprimentos de onda referentes à intensidade de absorção máxima de cada analito, tornando possível a quantificação de diversos elementos químicos de forma simultânea, com detectabilidade da ordem de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (SILVA, 2018; SKOOG *et al.*, 2006).

Em uma visão geral, a amostra, na forma líquida, é aspirada e transformada em um aerossol pelo nebulizador, segue para a câmara de nebulização, que seleciona as partículas do aerossol, onde as grandes ($> 5 \mu\text{m}$) são descartadas e seguem para o dreno, e aquelas com tamanho pequeno suficiente ($< 5 \mu\text{m}$) seguem para o plasma (FIGURA 6). Somente um volume de aproximadamente 5% do volume de amostra aspirado chega ao plasma, enquanto os outros 95% são descartados pelo dreno. No plasma, os átomos neutros ou íons são excitados e seus elétrons migram para um nível mais energético. Ao retornarem para o estado fundamental emitem radiação eletromagnética, que é então medida por um detector, sendo possível determinar a concentração do analito na amostra, tomando-se como base a lei de Lambert-Beer (SKOOG *et al.*, 2006).

FIGURA 6 – Esquema do sistema de introdução de amostras (nebulização e câmara de nebulização) e da tocha de quartzo (atomizador) do ICP OES.

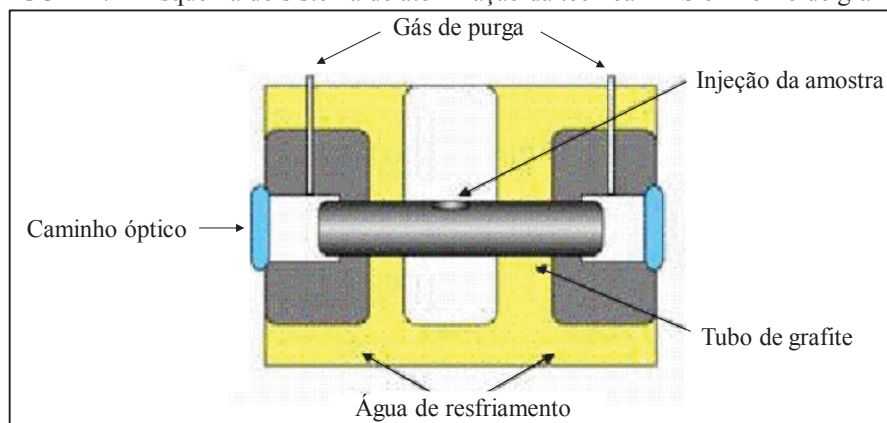


FONTE: Perkin Elmer (sem data).

Em comparação ao ICP OES, o GFAAS é uma técnica com um custo operacional associado menor e maior sensibilidade, necessita de injeção de um volume mínimo de amostra, entretanto, apresenta menor frequência analítica, poucas linhas de absorção podem ser selecionadas, além de apresentar uma faixa linear de trabalho muito restrita.

A técnica de GFAAS baseia-se na absorção de radiação por átomos livres, no estado gasoso. A radiação incidida no vapor atômico possui comprimento de onda específico para cada elemento, o que torna a técnica monoelementar. O processo de atomização (geração de átomos no estado gasoso) ocorre no interior de um tubo de grafite, aquecido eletricamente (FIGURA 7). Como o processo se passa no interior do tubo, o ambiente parcialmente fechado permite que a nuvem atômica da amostra permaneça por um tempo considerável no caminho óptico, melhorando a eficiência e a sensibilidade do equipamento, que consegue detectar elementos com concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ à ng L^{-1} , possibilitando a determinação do(s) analito(s) em nível traço-ultra-traços. (FERNANDES *et al.*, 2003; SKOOG, 2009).

FIGURA 7 – Esquema do sistema de atomização da técnica AAS em forno de grafite.

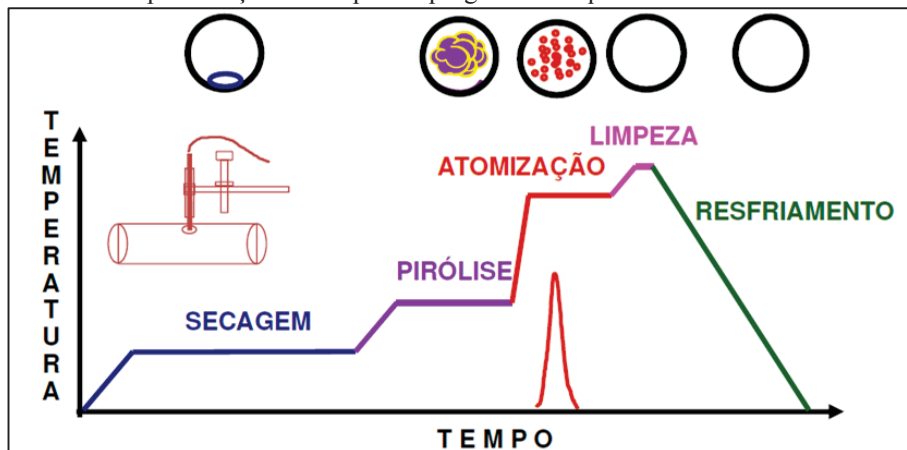


Fonte: Shimadzu (sem data).

As análises por GF AAS são realizadas seguindo um programa de aquecimento com etapas bem estabelecidas (FIGURA 8). Desta forma, um volume de amostra (10-100 μL) é injetado no interior de um tubo de grafite pirolítico. Este volume é referente à formação de uma gota da solução da amostra, que passa por uma etapa de secagem, onde ocorre a evaporação do solvente, restando um resíduo sólido no tubo. Posteriormente a temperatura é elevada (400 – 1300 $^{\circ}\text{C}$) de forma a alcançar a etapa de pirólise, que promove a eliminação de interferentes presentes na matriz, mantendo o analito dentro do tubo. A etapa posterior é a atomização, onde a temperatura é suficientemente elevada (1300-2400 $^{\circ}\text{C}$) para gerar uma nuvem atômica do analito e concomitantes. Como a fonte de radiação (lâmpada de cátodo oco – HCL) tem comprimento de onda específico para cada elemento, nesta etapa, os átomos

gasosos do analito absorvem esta radiação, gerando um sinal analítico do tipo transiente. A concentração do analito é determinada então pela integração da área do sinal transiente obtido. Finalmente, o tubo passa então por mais duas etapas, de limpeza (para eliminação de espécies refratárias) e resfriamento (WELZ & SPERLING, 1999).

FIGURA 8 – Representação das etapas do programa de aquecimento da técnica de GF AAS.



FONTE: Perkin Elmer (2009).

Na correção das interferências espectrais em GF AAS, utilizam-se, normalmente, os corretores de lâmpada de deutério ou por Efeito Zeeman. A lâmpada de deutério apresenta uma banda de emissão contínua (190 a 360 nm), que fornece uma estimativa da absorbância de fundo (proveniente dos concomitantes da matriz). A lâmpada de catodo oco fornece uma estimativa da absorbância do analito e de concomitantes que apresentam linhas de absorção próximas ao do analito. Desta forma, a eletrônica computacional calcula a diferença entre os sinais adquiridos (sinal do analito e sinal de fundo), fornecendo os valores de absorbância corrigidos, para o sinal do analito.

O corretor por efeito Zeeman baseia-se na formação de um campo magnético bastante intenso gerado por um ímã, onde os níveis de energia de transição eletrônica dos átomos sofrem um desdobramento. Este processo fornece um poder de resolução da razão sinal analítico/sinal de fundo muito maior que o corretor por lâmpada de deutério, uma vez que os níveis de energia desdobrados promovem a absorção referente ao sinal de fundo, enquanto o nível de energia original absorve somente o feixe referente à absorção do analito. (KRUG, NÓBREGA & OLIVEIRA, 2007).

O uso do corretor por efeito Zeeman se enquadra nas condições de *Stabilized Temperature Platform Furnace* – STPF, que são recomendações para a obtenção de um bom desempenho analítico no forno de grafite, garantindo exatidão, precisão, e reduzidas interferências espectrais. As condições de STPF compreendem: 1- uso de plataforma de

L'vov; 2- uso de modificador químico; 3- parada do gás de proteção durante a etapa de atomização; 4- modo de aquecimento transversal do tubo de grafite; 5- fonte eletrotérmica com elevada taxa de aquecimento; 6- cálculo de concentração por integração da área do sinal; 7- eletrônica compatível com a rápida formação do sinal transiente e; 8- sistemas de correção de fundo por efeito Zeeman (KRUG, NÓBREGA & OLIVEIRA, 2007; SKOOG *et al.*, 2006; WELZ & SPERLING, 1999).

Dentre estas condições, o uso da plataforma de L'vov foi avaliado neste estudo. A plataforma de L'vov é um aparato colocado dentro do tubo de grafite, com mínimo contato com as paredes do tubo. Devido ao contato reduzido, o aquecimento da plataforma ocorre principalmente por irradiação e equilíbrio térmico com o gás interno – que é aquecido por transferência de calor com a parede do tubo. Portanto, a temperatura da plataforma aumenta numa taxa de velocidade menor do que a parede do forno (SKOOG *et al.*, 2006; WELZ & SPERLING, 1999).

Sendo assim, na etapa de atomização na presença da plataforma de L'vov, o tempo necessário para a volatilização da amostra é maior, fazendo com que os átomos sejam lançados numa atmosfera mais homogênea, e ainda mais quente do que a parede do tubo. Na ausência dessa plataforma, a amostra em contato com a parede é rapidamente volatilizada, momento em que o equilíbrio térmico ainda não foi atingido, logo, é lançada em uma atmosfera mais fria e, por consequência, apresentando um gradiente de temperatura. Por proporcionar uma atmosfera mais quente e com menor gradiente de temperatura, o uso da plataforma de L'vov melhora a sensibilidade e a reprodutibilidade da técnica de GF AAS (SKOOG *et al.*, 2006; WELZ & SPERLING, 1999).

Desta forma, o tubo de grafite pirolítico com plataforma de L'vov foi empregado de forma a verificar se o uso deste aparato promoveria aumentos em termos de sensibilidade e reprodutibilidade dos métodos desenvolvidos quando as condições instrumentais e reacionais referentes aos métodos são estudadas finamente e em conjunto.

Outra condição STPF estudada neste trabalho foi o emprego de modificador químico nas análises foi bastante estudado neste trabalho. Modificadores químicos são substâncias inseridas no tubo de grafite juntamente com a amostra, em concentração muito superior ao analito. Alguns dos modificadores convencionais empregados na técnica de GF AAS são: $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, dentre estes, a mistura $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ é conhecida como modificador universal, estabilizando mais de 20 elementos químicos. Neste trabalho, o uso de modificador universal e $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ foi avaliado. (BORGES *et al.*, 2014; WELZ, SCHLEMMER & MUDAKAVI, 1992).

O nitrato de paládio interage com o analito, estabilizando e convertendo-o em uma forma menos volátil, permitindo o alcance de temperaturas de pirólise mais elevadas em relação ao ponto de ebulição do analito em sua forma pura, possibilitando que os interferentes sejam eliminados com maior eficiência. Essa estabilização é derivada de ligações covalentes formadas entre o paládio e o carbono da superfície do tubo de grafite na etapa de secagem. Nestas ligações, o paládio forma um composto de intercalação com o grafite, onde cada átomo do metal doa um elétron para o grafite e insere-se entre suas vacâncias. O elétron recebido pelo grafite fica deslocalizado em sua nuvem eletrônica, promovendo a retenção do analito, que permite o alcance de temperaturas de pirólise maiores que 800 °C para o elemento As, por exemplo (PRZEMYSŁAW, MARCIN & JERZY, 2002; VASILEIOS *et al.*, 2012; WELZ & SPERLING, 1999).

Contudo, geralmente a presença de modificador químico contribui para maiores limites de detecção (LOD's), uma vez que, em sua presença, os sinais analíticos são geralmente mais largos, de forma que a absorbância integrada seja menor, além de serem reagentes muito caros, aumentando o custo das análises químicas. Desta forma, o uso de modificadores químicos deve ser feito com devida precaução, levando-se em conta a real necessidade desse, como também a detectabilidade requerida nas determinações dos analitos (WELZ & SPERLING, 1999).

A avaliação dessa necessidade pode ser feita de diversas formas, dentre elas, por análises de materiais de referência certificados, ou experimentos de adição e recuperação, onde valores de recuperação no intervalo de 80-120% são aceitáveis por agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Comunidade Europeia e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), para frações mássicas maiores que 1 µg kg⁻¹. Esta avaliação também pode ser feita pelo parâmetro de desempenho conhecido como *signal-to-background ratio* (SBR), que é dado pela razão entre as intensidades do sinal analítico e sinal de fundo, esse último, podendo ser gerado por interferências de origem matricial ou espectral. O parâmetro SBR está correlacionado ao limite de detecção, onde maiores valores de SBR indicam melhor resolução entre sinal analítico/sinal de fundo atribuído às condições experimentais/instrumentais de cada método; portanto, quando maior o valor do parâmetro SBR, melhor é a sensibilidade do método, ou seja, menores são os LOD's alcançados (NOLTE, 2003 *apud* GUIMARÃES-SILVA *et al.*, 2012).

2.3. Estratégias de Preparo de Amostras

A maioria das técnicas de análise em níveis traços à ultra-traços geralmente necessita de preparo de amostras trabalhosos, por geralmente empregarem soluções líquidas das amostras na quantificação dos analitos. O preparo de amostras é uma das etapas mais críticas dentro de um protocolo analítico, sendo altamente suscetível a contaminação, e uma potencial fonte de erros nas análises químicas; entretanto, é uma etapa crucial, pois permite a disponibilização das espécies de interesse na matriz, para posterior determinação analítica (KRUG, 2010).

Para estes fins, as amostras devem ser submetidas a diferentes estratégias de preparo, que variam de acordo com os elementos a serem determinados, as técnicas a serem empregadas, o nível de exatidão e precisão requeridos, a disponibilidade de equipamentos, materiais e reagentes, dentre outros fatores. Desta forma, algumas estratégias são bem estabelecidas, tais como: combustão visando à obtenção de cinzas (em geral formação de óxidos/hidróxidos dos elementos químicos que compõem a matriz) e consequente ressuspensão desse material em uma solução ácida (CHRISTIAN, 1986); como também o emprego de ondas ultrassônicas (KRUG, 2010). Contudo, é conhecido que tais procedimentos apresentam algumas desvantagens, tais como a possibilidade de contaminação da amostra e/ou perdas do analito por volatilização, afetando diretamente a exatidão e a precisão dos resultados analíticos.

Uma eficiente alternativa a estas estratégias de preparo de amostras para sementes é o emprego de digestão da amostra em meio ácido assistida por radiação de micro-ondas (TABELA 1) sem ou com cavidade (KINGSTON & HASWELL, 1997). Esta estratégia é consolidada na literatura, e, por ser conduzida em sistema fechado, gera mínimas perdas por volatilização, além de promover uma eficiente mineralização da matriz, devido ao uso da radiação micro-ondas e uso de reagentes oxidantes, como HNO_3 e H_2O_2 .

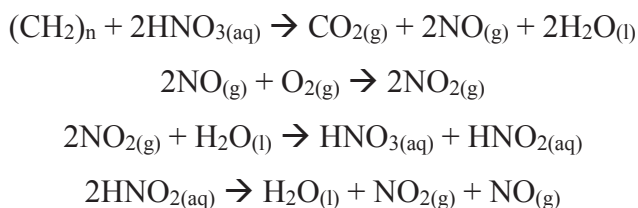
A utilização do forno de micro-ondas na maioria dos trabalhos propostos na literatura é recorrente devido ao alto teor de óleos na composição das sementes, podendo alcançar valores em torno de 35 % m m⁻¹. Devido à grande quantidade de óleo presente na amostra, faz-se necessário o uso de um método de digestão mais “agressivo”, com elevadas temperaturas e pressões, por isso a proposta do tratamento dessas amostras geralmente empregando radiação micro-ondas. A radiação de micro-ondas propriamente dita não possui energia suficiente para clivar ligações químicas, apenas possibilita uma efetiva migração das espécies iônicas constituintes da amostra para a solução extratora, bem como favorece a rotação dos dipolos das moléculas, fazendo com que o meio reacional seja aquecido de forma

bastante rápida e eficiente (CHAVES *et al.*, 2010; JURANOVIC, BREINHOELDER & STEFFAN, 2003; KRUG & ROCHA, 2016).

TABELA 1 – Misturas ácidas utilizadas para digestão de amostras de sementes e grãos.

Analitos	Matriz	Técnica de quantificação	Mistura oxidante	Referência
Ca, Mg, Fe, Cu.	Sementes de cânhamo, rabanete, terebinto, louro e urtiga.	ICP OES	HNO ₃ 65% m v ⁻¹	Uluata & Ozdemir. (2012)
Fe, Mn, Zn, Ni e Cu.	Sementes de cânhamo de cinco variedades.	GF AAS e FAAS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹	Mihoc <i>et al.</i> (2013)
Cd, B, Al, Co, Cu, Mo, Ni, Zn, Fe, Mn, Pb e Cr.	Sementes de cânhamo.	ICP OES	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Korkmaz <i>et al.</i> (2010)
Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, V e Zn.	20 produtos de goji (8 frutos, 6 sucos, 3 cápsulas e 3 misturas de frutos), 5 sucos de romã, 3 cápsulas de romã, 5 sementes de chia, 4 sucos de mangostim e 4 sucos de açaí.	ICP-MS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Llorent-Martinez <i>et al.</i> (2013)
Ag, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ga, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Rb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn.	Sementes de amaranto, chia, gergelim, linho e quinoa.	ICP OES	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + HCl 36% m v ⁻¹	Bolaños, Marchevsky & Camiña (2016)
Ca, K, Mg, Na, P, Al, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Ga, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sr e Zn.	Sementes de algodão, girassol, mamona, nabo forrageiro, feijão, soja e tungue.	ICP OES e ICP-MS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Chaves <i>et al.</i> (2010)
As.	Grãos de milho, feijão e soja.	HG-FAAS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + HCl 36% m v ⁻¹	Ribeiro <i>et al.</i> (2017)
Ca, Cd, Mg, Mn, Ti, Zn, Co, Cu, Fe, K, Mo, Na, Ni, Pb, V, Al, Cr e P.	Óleo e semente de abóbora.	ICP AES	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Juranovic, Breinhoelder & Stefan (2003)
Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd e Pb.	Semente de alcea rósea.	GF AAS e FAAS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Tian <i>et al.</i> (2014)
Al, Fe, Ti, Zn, Mn, Cu, Co, Ni, Cr, Ba, Sr, Cd, As, V, Mo e Pb.	Sementes de cereais (trigo, centeio, cevada), madeira, casca e agulhas de abeto e pinho.	ICP AES e ICP-MS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	Rodushkin, Ruth & Huhtasaari (1999)
Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr e Zn.	Fruto, mesocarpo e semente de cereja.	HG-FAAS	HNO ₃ 65% m v ⁻¹ + HCl 36% m v ⁻¹	Cindric <i>et al.</i> (2012)

O peróxido de hidrogênio possui a propriedade de aumentar o caráter oxidante do ácido nítrico, uma vez que, por meio de sua reação de decomposição, funciona como fonte de O₂, que reage com o NO proveniente da oxidação da matéria orgânica pelo ácido nítrico, aumentando a formação de NO₂ no frasco reacional. Este último é então hidrolisado, formando HNO₃ e HNO₂. O HNO₂ é oxidado a HNO₃ na presença do H₂O₂, aumentando também o poder oxidante do meio reacional (GONZALEZ *et al.*, 2009; KRUG, 2010). As reações que ocorrem neste processo são:



No interior dos tubos de teflon forma-se então um sistema de refluxo, que permite a decomposição mais eficiente da amostra, gerando baixos teores de carbono residual (RCC) (BARELA *et al.*, 2017). Baixos teores de carbono no digerido possibilitam maior eficiência de ionização de elementos químicos de alta energia ionizante, por meio de reações de transferência de carga de carbono. Em contrapartida, quantidades elevadas de carbono podem se depositar na superfície da tocha, ou ainda, obstruir o sistema de nebulização de amostra, provocando instabilidade no plasma e perda de poder de detecção da técnica (SAVIO, 2014).

O teor de carbono residual (RCC) indica o teor de carbono remanescente na solução após o procedimento de preparo. É um parâmetro que diz respeito à eficiência de digestão das amostras. De acordo com Gouveia *et al.* (2001), o RCC pode não afetar significativamente as técnicas espectroanalíticas, o que indica que é possível a obtenção de bons valores de exatidão e precisão das determinações, mesmo na presença de elevados valores de RCC. Wiltche apud Anschau estabeleceram o limite de 8000 mg L⁻¹ de teor de carbono, onde começam a ocorrer interferências nas determinações de As, Se e Be. Já Oliveira *et al.*, (2017), Grindlay *et al.*, (2013) e Grindlay *et al.*, (2008) determinaram o teor máximo de carbono de 5000 mg L⁻¹ para que não ocorram interferências na determinação de elementos com elevada energia de ionização (As, Se, Au, P, Te, Hg, dentre outros) em técnicas que fazem o uso de plasma como atomizador.

Gouveia *et al.* (2001) fez uso de três fontes de carbono para calibração, dentre as quais, glicose, ureia e L-cisteína, nas faixas de concentração de 0.05 - 0.25% m v⁻¹ de C. As determinações foram feitas nos comprimentos de onda de 193.025 e 247.857 nm, nas visões

axial e radial. Dentre as condições utilizadas, a visão axial mostrou maior sensibilidade (20 vezes maior que a radial), e a linha de emissão de 193.025 proporcionou menores valores de RSD, devido à maior sensibilidade desta linha comparada à de 247.857 nm. Foram analisados quatro materiais de referência certificados: NIST 1577b (fígado bovino), NIST 8435 (leite integral em pó), NIST 1515 (folhas de maçã) e NIST 1570^a (folhas de espinafre), onde foram obtidos valores de RCC de 7.79 – 16.6 % m m⁻¹, e recuperações de 97 – 104%.

Bizzi, *et al.*, (2010) determinaram o teor de carbono no comprimento de onda de 193.091 nm. Analisaram dois materiais de referência certificados: NIST 1577b (fígado bovino) e NIST 8414 (músculo bovino), obtendo recuperações de 96 – 105 %, com valores de RCC < 15% m m⁻¹. Marques *et al.*, (2017) analisaram a porcentagem de RCC em amostras de leite e sucos, onde valores de 16 – 29 % m m⁻¹ foram obtidos, a exatidão foi avaliada por meio da comparação com as digestões em vaso fechado. As análises foram desenvolvidas na linha de emissão de C de 199.091 nm.

Anschau *et al.*, (2019) analisaram 4 diferentes plantas medicinais com teor de carboidrato, gordura e proteína variando entre 35-55%, 30-45% e 15-24%, respectivamente, e verificaram a exatidão do método por análise do CRM NIST 8435 (leite integral em pó), com recuperações de 90-117%. As determinações foram feitas na linha de emissão de C de 193.030 nm. As concentrações de carbono residual foram menores que 720 mg L⁻¹, referente à RCCs < 17%. Wiltsche *et al.*, (2014) estudaram este parâmetro por meio da análise de sucos e leite em pó, avaliando a exatidão por meio da análise de 6 diferentes materiais de referência: BCR 62 (folhas de oliveira), DORM-2 (músculo de cação), NIST 1515 (folhas de maçã), NIST 1547 (folhas de pêssago), NIST 1567 (farinha de trigo), NIST 1568 (farinha de arroz), com recuperações de 94-105%, RSD < 3% e valores de RCC de 11-40%. Todas as análises de carbono foram desenvolvidas na linha de emissão de 193.091 nm, e as curvas de calibração foram preparadas por meio de solução padrão de biftalato de potássio.

Pichler, Haase e Knapp (1999) analisaram 4 CRMs: leite em pó (BCR 63 e BCR 151), fígado bovino (BCR 185) e rim de porco (BCR 186), com recuperações de 81-117%, e valores de RCC de 8,5 – 38%. As curvas de calibração foram preparadas por meio de solução padrão de biftalato de potássio. Hartwig *et al.*, (2017) analisaram amostras de margarina. A exatidão e precisão foram avaliadas por meio de análise de CRM de plâncton (BCR 414), e foram obtidas recuperações de 94-99%, RSD < 7% e RCC < 1.5%. A curva de calibração foi preparada pela dissolução de ácido cítrico em HNO₃ 5% v v⁻¹, com faixa linear de 10-250 mg L⁻¹ de C, que foi monitorado na linha de emissão de 193.094 nm.

Marques *et al.*, (2015) investigaram amostras de fígado e músculo bovino, camarão, laranja e folhas de tomate e espinafre. Os materiais de referência utilizados foram NIST 1515 (folhas de maçã) e NIST 1577b (fígado bovino). Os valores de RCC obtidos nas análises variaram de 5-59 %, dependendo das condições reacionais de digestão empregadas. Foram obtidas recuperações de 71-104%, com valores menores que 80% para Mn e S. As curvas de calibração foram preparadas por meio de solução padrão de biftalato de potássio.

Ni *et al.*, (2019) analisaram diferentes amostras de óleos de sementes e nozes, e obtiveram valores de RCC entre 1.2-7.5 %, equivalente a 601-3759 mg L⁻¹ de teor de carbono na solução. Recuperações de 91-108% foram obtidas por testes de adição e recuperação em dois níveis de concentração (0.02 e 2 µg g⁻¹), devido à ausência de material de referência certificado de óleos vegetais. A curva de calibração foi preparada na faixa de 100-10000 mg L⁻¹ de C, preparada a partir de uma solução padrão de ácido cítrico. A emissão de carbono foi monitorada na linha de 193.025 nm.

Estes estudos permitem verificar que não existe um limite de RCC onde é possível inferir com absoluta certeza que não haverá interferências nas análises, uma vez que o teor de carbono na solução pode variar de acordo com tipos e quantidades de reagentes e amostras durante o preparo de amostras desenvolvido, alcançando bons resultados de exatidão e precisão mesmo com elevados valores de RCC.

Apesar de bem documentada e amplamente empregada em análises de rotina, a digestão ácida em forno micro-ondas apresenta-se como uma técnica morosa e de baixa frequência analítica. Nesse contexto, o GF AAS apresenta a vantagem de possibilitar a análise da amostra tanto na forma de uma suspensão (*'slurry'*) como também a análise direta da amostra, isto é, quando em sua forma sólida, (*'solid sampling'*) empregando assim mínima manipulação da amostra (FLORES *et al.*, 2004; NOMURA, SILVA & OLIVEIRA, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2007).

Na análise da amostra por meio de uma suspensão, esta é submetida ao processo de moagem, para melhor homogeneização/representatividade, sendo em seguida, dispersa em um líquido, comumente em soluções aquosas que podem ser ácidas, alcalinas ou neutras. Esta vantagem associada ao GF AAS, reduz significativamente potenciais riscos de contaminação devido à diminuição da quantidade de reagentes empregados e a mínima manipulação da amostra, minimizando possíveis perdas do analito, além de gerar quantidades mínimas de resíduos, viabilizando a frequência analítica das análises químicas (FLORES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007).

Dentro desse contexto, a solubilização alcalina de amostras vem sendo bastante empregada em diversos estudos (TABELA 2) (NÓBREGA *et al.*, 2006; ORESTE *et al.*; 2013; VAN BEIK *et al.*, 2017).

TABELA 2 – Misturas alcalinas utilizadas para solubilização de amostras de diversas matrizes.

Analitos	Matriz	Técnica de quantificação	Mistura reacional	Referência
Ca, K, Mg, Na, Fe, Mn e Zn.	Folhas de chá, fígado bovino e folhas de maçã.	GF AAS e FAAS	TMAH 25% m v^{-1} + EDTA	Zhou <i>et al.</i> (1996)
Cu, Cd, Pb, Ni, Mn e Cr	Plantas aquáticas, fígado e músculo de cação e pâncreas de lagosta.	GF AAS	TMAH 25% m v^{-1}	Silva <i>et al.</i> (1999)
Fe.	Farelo de milho, farinha de trigo, folhas de maçã, folhas cítricas, farinha de arroz, folhas e raízes de arroz.	GF AAS	TMAH 25% m v^{-1}	Silva <i>et al.</i> (2003)
I.	Semente de ervilha, semente de abóbora e aquênios de trigo sarraceno.	ICP-MS	TMAH 25% m v^{-1}	Jerse <i>et al.</i> (2018)
As, Cd, Pb e Se.	Arroz.	GF AAS	TMAH 25% m v^{-1}	Oliveira <i>et al.</i> (2016)
Cu, Ge, Mn, Mo, Ni, Sb, Sr, Ti e V.	Óleo de amêndoas, óleo de girassol, óleo de milho e diferentes tipos de azeite de oliva.	ICP-MS	TMAH 25% m v^{-1} + HNO_3 65% m v^{-1}	Savio <i>et al.</i> (2014)
P, Zn, Ni, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Cu, Sr, Na e K.	Cabelo, mexilhão, folhas de chá, sargaço, farinha de arroz e fígado bovino.	ICP OES	TMAH 25% m v^{-1} + EDTA	Uchida <i>et al.</i> (1992)
Se.	Ovo em pó, músculo e fígado de cação, farinha de trigo e sementes de colza.	GFAAS	TMAH 25% m v^{-1} + $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Chen & Marshall (1999)

A eficiência de solubilização do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) depende de fatores como: o tipo de matriz, tamanho de partícula, concentração do solvente, tempo e temperatura de solubilização. O uso do TMAH no preparo de suspensões de diversas amostras é altamente compatível com a técnica GF AAS, proporcionando elevadas exatidão, precisão, e bom desempenho instrumental. Outra grande vantagem é a maior durabilidade do tubo de grafite, uma vez que o TMAH não é agressivo ao tubo, o que geralmente não é observado em meio ácido (RIBEIRO, CURTIUS & POZEBON, 2000). Além disso, menores tempos de preparo são requeridos, bem como mínima manipulação da amostra, aumentando a frequência analítica e diminuindo a ocorrência de erros nesta etapa. Apesar das vantagens, devido ao teor de carbono presente na composição molecular do TMAH, ($\text{C}_4\text{H}_{13}\text{NO}$) este

solvente promove elevados sinais de fundo no branco analítico na técnica de GF AAS, além de apresentar elevada viscosidade, tornando necessária a diluição deste reagente na etapa de preparo de amostra. Contudo essas desvantagens associadas ao reagente TMAH são passíveis de serem contornadas quando o método analítico é cuidadosamente otimizado reduzindo significativamente a contribuição do TMAH no valor do branco analítico, sendo possível obter métodos com sensibilidade analítica comparável aos métodos analíticos empregando soluções ácidas em técnicas espectrométricas (CAMPOS, *et al.*, 2018; LÓPEZ-GARCÍA, BRICEÑO & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 2011).

Na técnica de GF AAS, a otimização das condições instrumentais permite o tratamento térmico da amostra durante as etapas de secagem e pirólise, onde durante essas etapas do programa de aquecimento, o solvente e a matriz são em maior parte volatilizados e eliminados do atomizador, sendo o analito então quantificado na etapa de atomização. Desta forma, a finalização do preparo de amostras ocorre dentro do tubo de grafite (atomizador).

Desta forma, o presente trabalho teve como desafio analítico estabelecer um método para a quantificação dos contaminantes inorgânicos As, Cd e Pb nas sementes e derivados de cânhamo. Quando possível o uso de modificador químico foi reduzido, o que geralmente não é levado em consideração na maioria das análises por GF AAS, onde a presença do modificador em quantidades geralmente já padronizadas/consolidadas na literatura são utilizadas para as análises de diversos tipos de amostras. Sendo assim, utilizando apenas o corretor de fundo (*background*) do equipamento GF AAS (lâmpada de deutério), associado às condições ótimas de análise estudadas (tratamento de amostras e parâmetros instrumentais) e avaliando-se a real necessidade do emprego do modificador químico, estudou-se a possibilidade de quantificação desses analitos, explorando todas as potencialidades do GF AAS para o desenvolvimento dos métodos analíticos aqui propostos (FLORES *et al.*, 2004; NOMURA, SILVA & OLIVEIRA, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Traçar a composição química inorgânica, bem como avaliar a toxicidade das amostras de sementes de cânhamo e seus derivados, empregando técnicas analíticas espectrométricas como ICP OES e GF AAS.

3.2. Objetivos específicos

- * Avaliar diferentes procedimentos de digestão das amostras em meio ácido assistida por radiação micro-ondas visando à quantificação do teor total dos constituintes inorgânicos presentes nas amostras de estudo, (*screening* do perfil inorgânico da amostra) por ICP OES;
- * Investigar estratégias de preparo de amostras, empregando tratamento ácido ou solubilização alcalina, visando à obtenção de uma suspensão das amostras compatível com a técnica GF AAS para a quantificação dos elementos potencialmente tóxicos: As, Cd e Pb;
- * Desenvolver métodos analíticos, avaliando: 1- a necessidade do uso do modificador químico na quantificação dos analitos por GF AAS; 2- a capacidade do GF AAS na resolução do sinal analítico e sinal de fundo por meio do parâmetro *signal-to-background ratio* (SBR), quando parâmetros instrumentais e condições reacionais de atomização são modificadas.
- * Avaliar os parâmetros de validação pertinentes, que indicam confiabilidade, precisão e sensibilidade ao método proposto, tais como: seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ);
- * Explorar as potencialidades do GF AAS em acordo com o preparo de amostras que se mostrar eficiente e compatível à técnica, a fim de se reduzir etapas do procedimento analítico, bem como tornar as análises mais simples, reduzindo custos e facilitando sua aplicação em laboratórios de análises de alimentos;
- * Estimar o caráter essencial e/ou tóxico das sementes de cânhamo e seus derivados.

4. Materiais e métodos

4.1. Amostras, Reagentes, Soluções Padrão

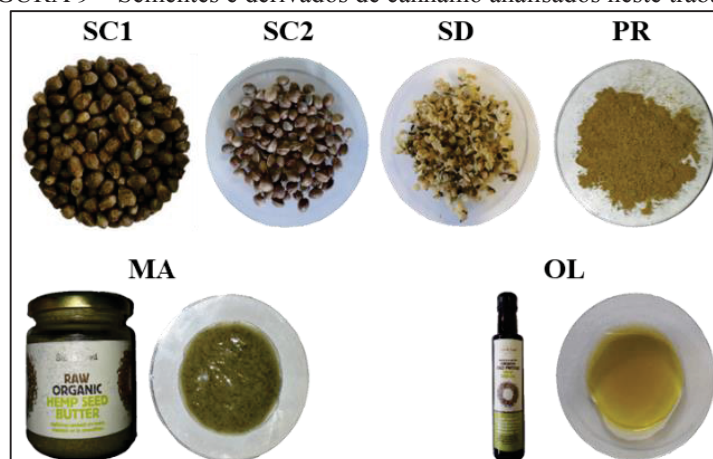
Os materiais utilizados (balões volumétricos, béqueres, ponteiras, eppendorfs, entre outros) foram previamente limpos, deixados em banho ácido de HNO_3 10 % v v⁻¹ (Carlo Erba Analyticals) por pelo menos 24 horas e, em seguida, lavados três vezes com água ultrapura, obtida pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA), com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C.

Soluções padrão contendo 1000 mg L⁻¹ em HNO_3 1 % v v⁻¹ (SpecSol, Curitiba, Brasil) de cada analito foram empregadas no preparo das soluções padrão multielementar para a construção das curvas analíticas de calibração, e mantidas em refrigeração durante todo o período de execução do trabalho. As soluções foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas da marca LABMATE, modelo Pro LMP para 100, 1000 e 10000 µL.

No preparo das soluções padrão intermediárias, suspensões das amostras e digestões ácidas, utilizou-se o ácido HNO_3 65 m v⁻¹ (Alphatec, grau P.A) e H_2O_2 30 % v v⁻¹ (Vetec, grau P.A.). Todo o HNO_3 65 % m v⁻¹ empregado neste trabalho passou por um processo de destilação, no destilador Distillacid (Berghof Products®), operando em temperatura na faixa de 10 a 20 °C abaixo do ponto de ebulição do ácido (sistema “*subboiling*”). Para as solubilizações alcalinas utilizou-se o hidróxido de tetrametilamônio – TMAH, 25 % m v⁻¹ em água (Sigma Aldrich).

As amostras de sementes de cânhamo e seus derivados (FIGURA 9), objeto de estudo desse trabalho, foram adquiridas em comércio internacional (*online*) e por fornecedores parceiros. Todas as amostras foram pesadas utilizando-se a balança analítica da marca Bel, modelo M124Ai, com precisão de 0,0001g. Seguem abaixo as fotos das amostras e suas respectivas identificações (sementes de cânhamo com casca – SC1 e SC2, sementes de cânhamo descascadas (SD), proteína de cânhamo (PR), manteiga de cânhamo (MA) e óleo de cânhamo (OL).

FIGURA 9 – Sementes e derivados de cânhamo analisados neste trabalho.



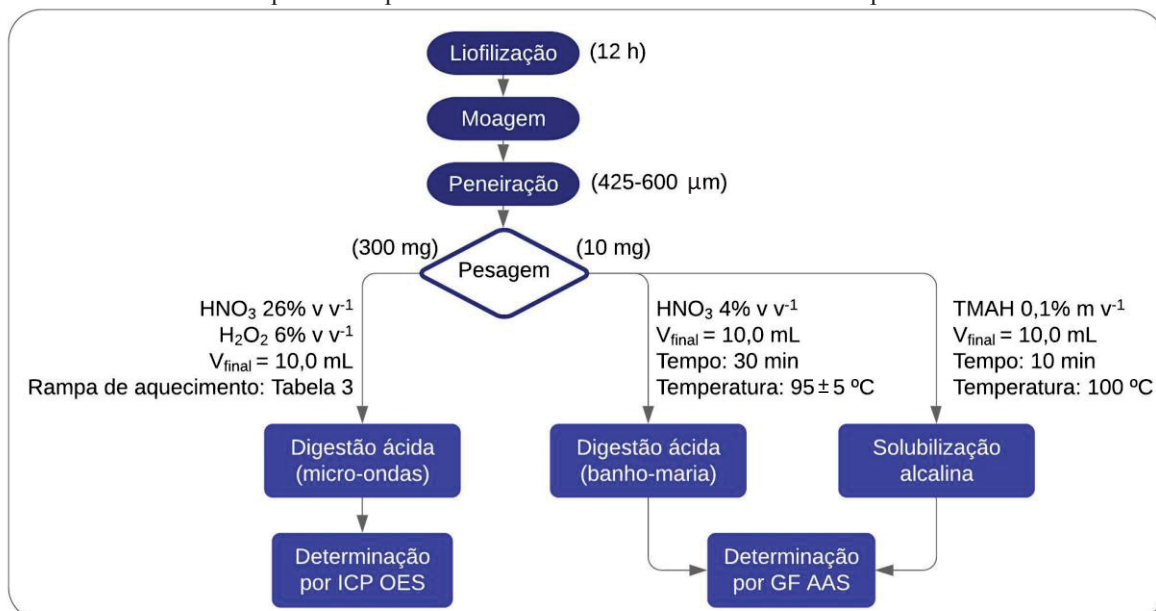
FONTE: a autora.

SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo; PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

4.2. Estratégias de Preparo de Amostras

A partir de informações obtidas na literatura (GALIC *et al.*, 2019; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SAVIO *et al.*, 2014; SIANO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 1996), foram realizados experimentos com proteína de cânhamo (PR) empregando diferentes estratégias de preparo, como mostrado no esquema (FIGURA 10) que resume os procedimentos adotados no trabalho.

FIGURA 10 – Esquema dos procedimentos desenvolvidos com a amostra proteína de cânhamo.



FONTE: a autora

4.3. Caracterização da Composição Química Inorgânica das Sementes de Cânhamo e seus Derivados por ICP OES.

Para as análises por ICP OES, estudaram-se diferentes condições reacionais de preparo de amostras para a determinação do teor total dos analitos, a fim de se caracterizar o perfil químico inorgânico das diferentes amostras de cânhamo analisadas. Levando-se em conta a necessidade de completa digestão (mineralização) das amostras, procedeu-se com a metodologia de digestão em meio ácido assistida por radiação micro-ondas empregando as condições reportadas na TABELA 3.

TABELA 3 – Condições reacionais empregadas na digestão das amostras de cânhamo e programa de aquecimento empregado no forno de micro-ondas. (Forno de micro-ondas modelo Multiwave Go, marca Anton Paar). Massa de amostra empregada: 300 mg.

	Volume dos reagentes	Programa de aquecimento Tempo (min); Temperatura (°C)
Condição 1	2 mL - HNO ₃ 65% m v ⁻¹	^R 10; 125
	1 mL - H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	
	7 mL - H ₂ O ultrapura	
Condição 2	3 mL - HNO ₃ 65% m v ⁻¹	^H 5; 125
	1.5 mL - H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	^R 5; 180
	5.5 mL - H ₂ O ultrapura	^H 15; 180
Condição 3	4 mL - HNO ₃ 65% m v ⁻¹	^C 12; 55
	2 mL - H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹	
	4 mL - H ₂ O ultrapura	

^R – Ramp; ^H – Hold; ^C – Cooling.

* – Ao final da digestão, as soluções foram avolumadas a 20 mL com água ultrapura.

O equipamento ICP OES empregado nas análises químicas apresenta a configuração dual view, modelo OPTIMA 8300, marca Perkin Elmer, localizado no Departamento de Química da UTFPR, sede Ecoville. Utilizou-se o equipamento em configuração axial para a quantificação dos microelementos (1 ppm - 0,1 % → Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Na, Pb, Sn, Sr, V e Zn) e a visão radial para a quantificação dos macroelementos (0,1 - 100 % → Ca, K, Mg e P) (SKOOG *et al.*, 2006). O gás utilizado foi o argônio, com grau de pureza de 99,998%. As condições instrumentais utilizadas estão descritas na TABELA 4.

TABELA 4 – Condições instrumentais do ICP OES para a determinação dos elementos químicos nas amostras de estudo.

Potência de radiofrequência	1300 W
Vazão do gás do plasma	8,00 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,20 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	0,55 L min ⁻¹
Sistema de nebulização	Meinhard / Câmara ciclônica
Replicatas	3
Vazão da bomba peristáltica	1,5 mL min ⁻¹
Elementos (λ - nm)	
Monitorados na linha de emissão atômica (I)	Ag - 328,068; Al - 396,153; As - 188,979; Ba - 233,527; Be - 313,107; Ca - 317,933; Cd - 228,802; Cu 327,393; K - 766,490; Na - 589,592; P - 213,617; Zn - 206,200.
Monitorados na linha de emissão iônica (II)	Co - 228,616; Cr - 267,716; Fe - 238,204; Li 670,784; Mg - 285,213; Mn - 257,610; Mo - 202,031; Pb - 220,353; Sr - 421,552; V - 290,880.

4.3.1. Curvas Analíticas de Calibração (ANEXO 1).

Para as análises no ICP OES foram construídas curvas de calibração no intervalo de 2,00 – 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os microelementos e de 0,50 – 150 mg L^{-1} para os macroelementos, ambas em solução de HNO_3 1 % v v⁻¹. As curvas foram preparadas a partir da solução padrão estoque de cada elemento, de concentração 1000 mg L^{-1} .

4.3.2. Teor de Carbono Residual (*Residual Carbon Content* - RCC).

Para as determinações do teor de carbono residual (RCC), a curva de calibração do carbono foi de 1 – 2000 mg L^{-1} , preparada a partir de uma solução padrão de concentração 4,00 g L^{-1} de carbono (20 g L^{-1} de ureia - $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) em HNO_3 9 % v v⁻¹, conforme sugerido por GOUVEIA *et al.* (2001).

As determinações do teor de carbono residual foram realizadas para todas as amostras de cânhamo que foram previamente digeridas conforme condições reacionais da Tabela 3. Nessas análises as mesmas condições instrumentais do ICP OES foram empregadas para a quantificação de C (λ - 193,030 nm) na visão radial.

4.3.3. Estudo dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito).

O método foi validado seguindo procedimentos recomendados por agências reguladoras nacionais e internacionais, avaliando-se parâmetros como: exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018; THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

Os parâmetros exatidão (% de recuperação) e precisão (RSD) foram avaliados por análises de materiais de referência certificados (CRM) de matriz vegetal com composição química e nutricional similar à semente de cânhamo (LUENGO *et al.*, 2019). Desta forma,

elementos traço em folhas de espinafre, folhas de tomate (SRM 1570a e SRM 1573a - respectivamente), e folhas de chá verde (GBW 10052 - Chinese Academy of Geological Sciences) foram empregados nas análises de exatidão para os métodos propostos. As curvas analíticas de calibração foram plotadas usando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

A recuperação foi calculada segundo a EQUAÇÃO 1, determinada pelas agências reguladoras, onde C é a concentração em mg kg⁻¹ de cada analito.

$$\text{EQUAÇÃO 1: Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{encontrada}}}{C_{\text{certificada}}} \times 100$$

Os valores de LOD e LOQ foram determinados pelas EQUAÇÕES 2 e 3, conforme sugerido por Thomsen, Schatzlein e Mercurio (2003):

$$\text{EQUAÇÃO 2: } LOD = \frac{3 * RSD * BEC}{100} \qquad \text{EQUAÇÃO 3: } LOQ = \frac{10 * RSD * BEC}{100}$$

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \qquad BEC = \frac{C_{\text{padrão}}}{SBR} \qquad SBR = \frac{I_{\text{padrão}} - I_{\text{fundo}}}{I_{\text{fundo}}}$$

Onde:

RSD é o desvio padrão relativo;

BEC (*Background Equivalent Concentration*) é a concentração equivalente de fundo;

SBR (*Signal-to-Background ratio*) é a razão entre sinal analítico e sinal de fundo.

4.4. Avaliação dos Elementos Potencialmente Tóxicos (As, Cd e Pb) nas Sementes de Cânhamo e seus Derivados por GF AAS.

Todas as análises de As, Cd e Pb das digestões ácidas e solubilizações alcalinas das sementes de cânhamo e derivados foram realizadas no instrumento GF AAS, de caráter multiusuário, da Shimadzu, modelo AA 6800F/6800G, equipado com corretor de fundo de lâmpada de Deutério e aquecimento longitudinal, localizado no laboratório do Grupo de Química Analítica do Departamento de Química da UFPR (Centro Politécnico).

As quantificações desses analitos foram realizadas sob as condições de largura de fenda de 1,0 nm, modo de aquisição de sinal por integração da área do pico, calibração por curvas analíticas em níveis de concentração de 0,05 – 3,0 µg L⁻¹ e número de replicatas = 6, tubo de grafite pirolítico com modo de aquecimento longitudinal, e volume injetado de

amostra de 20 µL. Argônio de grau analítico (99,999%) foi empregado como gás de purga e protetor. Quando necessário, o modificador químico utilizado (5 µL) foi o $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. As condições instrumentais para cada um dos elementos químicos estudados até o momento estão descritas na tabela abaixo (TABELA 5).

TABELA 5 – Condições instrumentais para a determinação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e derivados por GF AAS.

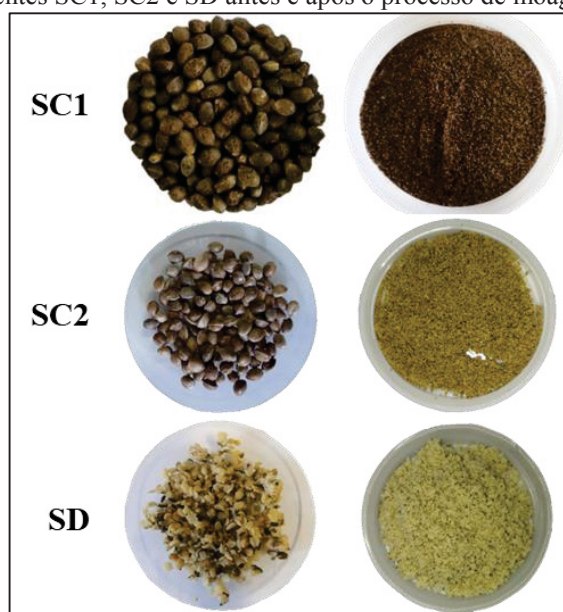
Analito	As	Cd	Pb
Comprimento de onda (nm)	193,7	228,8	283,3
Corrente da lâmpada (mA)	12	8	20
Volume injetado de modificador (µL)	5	5	-
Quantidade de modificador (µg)	3	0,5	-

4.4.1. Processamento das Amostras de Sementes de Cânhamo.

Para as análises por GF AAS, estabeleceram-se estratégias de preparo de amostras que permitissem o desenvolvimento de um método analítico para promover a determinação do teor total de As, Cd e Pb, analitos os quais o ICP OES não apresenta nível de detectabilidade suficiente para quantificar com adequada exatidão e precisão.

Inicialmente, para a moagem das amostras em estudo, procedeu-se com o processo de liofilização (Liofilizador Terroni, série Enterprise I) por 12h, e então as amostras foram maceradas com auxílio de gral e pistilo, e peneiradas, permitindo a caracterização de partículas pequenas (425 - 600 µm) e homogêneas (FIGURA 11) viabilizando a formação de uma suspensão representativa.

FIGURA 11 – Sementes SC1, SC2 e SD antes e após o processo de moagem, respectivamente.



FONTE: a autora.

SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca

4.4.2. Procedimento de otimização das condições instrumentais do GF AAS.

Para a otimização, das temperaturas de pirólise e de atomização, todas as soluções foram preparadas em duplicata, sendo constituídas por:

- 1) Soluções contendo as amostras não fortificadas em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹, denominadas “branco de amostra” (concentração de analito inferior ao limite de quantificação do método);
- 2) Soluções contendo as amostras fortificadas previamente à digestão, com 15 µg L⁻¹ de analito em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹;
- 3) Soluções de HNO_3 1 % v v⁻¹ fortificadas com 15 µg L⁻¹ de analito (solução de referência);
- 4) Solução de HNO_3 1 % v v⁻¹;

Estas foram preparadas a fim de se avaliar a seletividade e a exatidão do método proposto. Para isso, avaliou-se a razão sinal analítico/sinal de fundo (SBR), bem como os valores do desvio padrão relativo (RSD) e a recuperação dos analitos, segundo o INMETRO (2018). Para melhor visualizar o perfil do sinal analítico, ou seja, a simetria do pico obtido, como também a razão SBR, foram empregados níveis de concentração (15 µg L⁻¹) dos analitos de modo a permitir uma análise confiável para esses parâmetros.

Para os cálculos de recuperação, as amostras foram fortificadas previamente ao procedimento de preparo, e a recuperação foi avaliada pela razão da absorbância (A) da amostra fortificada pela absorbância da solução referência (EQUAÇÃO 4).

$$\text{EQUAÇÃO 4: Recuperação (\%)} = \frac{A_{\text{amostra fortificada}} - A_{\text{branco de amostra}}}{A_{\text{solução de referência}}} \times 100$$

Para realizar o estudo das condições instrumentais de análise, em um primeiro momento fixou-se a temperatura de atomização e variou-se somente a temperatura de pirólise em incrementos de 50 e/ou 100 °C, à depender da necessidade de ampliação de informações na faixa de temperatura de interesse.

Encontrada a temperatura de pirólise ideal, esta foi fixada, e a temperatura de atomização foi estudada (LOBO, 2009). Os intervalos das temperaturas de pirólise e atomização inicialmente estudadas foram obtidos a partir de uma análise prévia na literatura, conforme reportado na TABELA 6.

TABELA 6 – Condições experimentais para a otimização univariada das temperaturas de pirólise e de atomização para As, Cd e Pb. Volume de injeção de amostra: 20µL e 5µL de modificador, quando empregado.

Analito	Temperatura de atomização (°C)	Temperatura de pirólise (°C)	Modificador
As	2100 – 2600	700 – 1200	Pd(NO ₃) ₂
Cd	1400 – 2000	300 – 700	Pd(NO ₃) ₂
Pb	1700 – 2300	400 – 700	-

4.4.3. Procedimento para o Tratamento ácido das amostras.

O primeiro elemento estudado foi o arsênio. Inicialmente, um rastreamento das variáveis foi realizado empregado um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} a fim de se avaliar quais das variáveis selecionadas afetariam significativamente o preparo de amostras, como também a separação térmica do analito da matriz no tubo de grafite (atomizador). As variáveis estudadas foram: concentração de H₂O₂ (0 – 6 % v v⁻¹), concentração de HNO₃ (2 - 6% v v⁻¹), massa de amostra (10 - 50 mg), quantidade de modificador químico (1 - 7 µg), temperatura de pirólise (800 - 1100 °C) e temperatura de atomização (2100 - 2400 °C).

Os procedimentos de digestão (10 mg de amostra e 620 µL de HNO₃ 65 % m v⁻¹) foram realizados em banho-maria, durante 30 min, sob temperatura de 95 ± 5 °C, e os digeridos avolumados à 10,0 mL com água ultrapura (concentração de HNO₃ final de 4 % v v⁻¹) (FIGURA 12). Os valores de recuperações obtidos para os analitos (conforme Equação 4) no estudo foram usados como parâmetro de avaliação (variável dependente) das diferentes condições estudadas no planejamento. Os experimentos foram realizados randomicamente, e os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos usando o software Statistica 7.0 (StarSoft, Tulsa, USA).

FIGURA 12 – Esquema de preparo da semente de cânhamo e derivados com tratamento ácido, obtido a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} com ponto central.



FONTE: a autora.

Obtidos os resultados preliminares referentes à triagem das variáveis significativas tanto para o preparo de amostras como para as condições instrumentais de análise, outros planejamentos fatoriais foram empregados a fim de se refinar o presente estudo visando encontrar as condições ótimas de análise para os métodos propostos.

4.4.4. Procedimento para a solubilização alcalina das amostras.

O tratamento alcalino foi estudado como um método alternativo ao tratamento ácido das amostras. Nesse estudo, um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central foi empregado, para a avaliação das seguintes variáveis: tempo de solubilização (10 – 30 minutos), concentração de TMAH (0,10 – 10 % m v^{-1}) e aquecimento (50 – 100 $^{\circ}\text{C}$). Os experimentos foram realizados em ordem randômica, empregando massa de amostra de 10 mg previamente fortificadas com As em concentração equivalente à 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. O aquecimento das amostras foi realizado empregando radiação assistida por micro-ondas, conforme o programa de aquecimento reportado na TABELA 7.

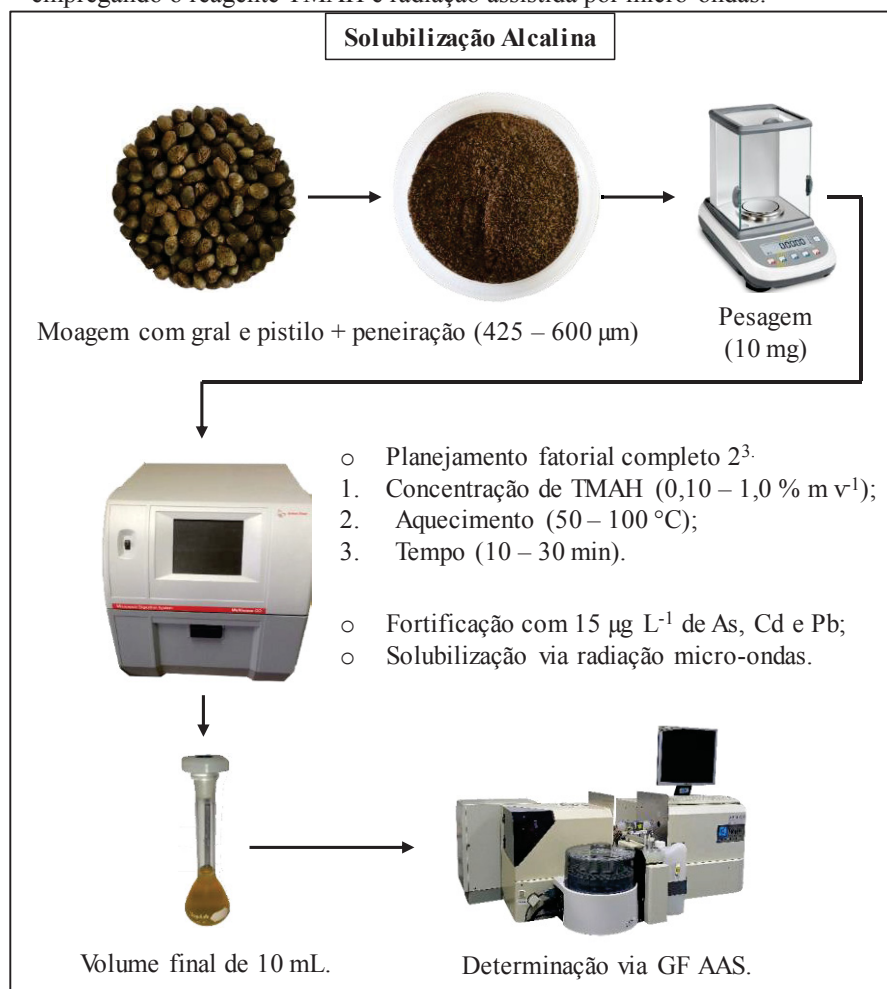
TABELA 7 – Programa de aquecimento empregado no Forno de Micro-ondas para solubilização das amostras de cânhamo em meio de TMAH. (Forno de micro-ondas modelo Multiwave Go, marca Anton Paar). Massa de amostra empregada: 10 mg.

Programa de aquecimento Tempo (min); Temperatura (°C)		
Nível mínimo (-)	Central (0)	Nível máximo (+)
^R 5; 50	^R 5; 75	^R 5; 100
^H 10; 50	^H 10; 75	^H 10; 100
	^C 5; 50	^C 12; 50

^R – Ramp; ^H – Hold; ^C – Cooling.

As amostras foram preparadas seguindo o esquema abaixo (FIGURA 13). As otimizações iniciais do preparo foram realizadas para o elemento arsênio.

FIGURA 13 – Esquema de preparo de amostras de semente de cânhamo e derivados por solubilização alcalina, empregando o reagente TMAH e radiação assistida por micro-ondas.



FONTE: a autora.

4.4.5. Estudo dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito).

O método foi validado seguindo procedimentos recomendados por agências reguladoras nacionais e internacionais, avaliando-se parâmetros como: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018; THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

A linearidade foi avaliada por meio de uma curva de calibração externa, em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ nas faixas de 0,60 – 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para arsênio, 0,05 – 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cádmio e 0,40 – 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para chumbo. Os parâmetros exatidão (% de recuperação) e precisão (RSD) foram avaliados por testes de adição e recuperação em três níveis de fortificação, que compreenderam toda a faixa linear da curva analítica, ou seja: 1,00; 2,00 e 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (As), 0,05; 1,00 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd) e 0,40; 1,50 e 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), com número de replicatas (n) = 6. Os analitos foram previamente adicionados às amostras de proteína de cânhamo, que seguiram então para o procedimento de preparo de amostras e posterior análise. Para chumbo e cádmio esses parâmetros também foram avaliados por análises de materiais de referência certificados (CRM) de matriz vegetal com composição química e nutricional similar à semente de cânhamo (LUENGO *et al.*, 2019). Desta forma, elementos traço em folhas de espinafre, folhas de tomate (SRM 1570a e SRM 1573a - respectivamente), e folhas de chá verde (GBW 10052 - Chinese Academy of Geological Sciences) foram empregados nas análises de exatidão para os métodos propostos. As curvas analíticas de calibração foram plotadas usando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

5. Resultados e Discussão

5.1. Estratégias de Preparo de Amostras para a quantificação dos analitos por ICP OES.

Com relação à otimização da etapa de tratamento de amostras para a determinação do teor total dos elementos inorgânicos por ICP OES, foi feito um estudo prévio sobre metodologias de preparo de amostras com matrizes correlatas, e observado que grande parte desses estudos propõem, na literatura, o tratamento dessas amostras empregando maceração e/ou moagem, peneiramento, e digestão ácida - geralmente em forno de micro-ondas (KORKMAZ *et al.*, 2010; MIHOC *et al.*, 2013; SUVAR *et al.*, 2016; ULUATA & OZDEMIR, 2012).

Considerando-se este método de preparo de amostras, utilizou-se HNO_3 65 % m v^{-1} associado a H_2O_2 30 % v v^{-1} , de forma a aumentar o caráter oxidante da mistura reacional, potencializando a eficiência de digestão da amostra. A proposta do emprego de ácidos minerais diluídos visa diminuir a acidez residual do digerido, fator que tende a minimizar o desgaste nos equipamentos, acidentes operacionais, geração de resíduos e obtenção de sinais analíticos elevados nas provas em branco; melhorando a precisão das medidas. Apesar de diluídos, o caráter oxidante do HNO_3 associado ao H_2O_2 associados à alta pressão do sistema fechado, são condições suficientes para promover a eficiente digestão da matriz. (ARSLAN & TYSON, 2007; BRADSHAW & SLAVIN, 1989; KRUG, 2010).

O método de digestão em chapa de aquecimento foi escolhido como teste preliminar pela facilidade de manuseio e acessibilidade quando comparado à técnica por forno de micro-ondas. Apesar da disponibilidade em tempo integral da chapa de aquecimento, o tempo necessário para a digestão foi bastante elevado, em torno de 2 horas, quando comparado às digestões por micro-ondas. Os valores de RSD obtidos nas análises mostraram-se elevados ($> 10\%$), devido ao fato de ser um sistema aberto, possibilitando perda de analitos voláteis, tais como As, Cd, P, Se, dentre outros. Desta forma, esse modo de preparo de amostras não foi adotado nos estudos subsequentes, sendo analisadas as amostras mineralizadas em meio ácido assistida com radiação de micro-ondas.

As estratégias de preparo em meio ácido por radiação micro-ondas estão apresentadas na Tabela 3. Considerando uma massa de amostra de 300 mg a condição 1 (2 mL de HNO_3 65% m v^{-1} , 1 mL de H_2O_2 30% v v^{-1} e 7 mL de H_2O) testada apresentou digeridos com corpo de fundo e forte coloração amarelada, de forma que esta condição foi descartada para as análises. Os extratos dos digeridos da condição 2 apresentaram concentração de HNO_3 de 20 % v v^{-1} (3 mL de HNO_3 65% m v^{-1} , 1,5 mL de H_2O_2 30% v v^{-1}

¹ e 5,5 mL de H₂O), o processo de digestão mostrou-se visualmente eficiente, obtendo-se valores de recuperação e de RSD satisfatórios para a maioria dos constituintes inorgânicos, com exceção para o ferro.

A baixa recuperação nas determinações de ferro em amostras de arroz (24%) foi relatada em estudo anterior, sendo explicada pela elevada afinidade desse elemento pela proteína ferritina, que é capaz de armazenar 4.500 átomos de ferro em sua estrutura, mantendo-se estável, e, devido à este fenômeno, ocorre maior dificuldade de mineralização do ferro, resultando em baixas porcentagens de recuperação para este elemento (OLIVEIRA, BACCAN & CADORE, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2009; THEIL, MATZAPETAKIS & LIU, 2006).

Haja vista os problemas encontrados para quantificação do ferro nos alimentos de cânhamo, foi necessário elevar um pouco mais a concentração de HNO₃ para 26 % v v⁻¹ (4 mL de HNO₃ 65% m v⁻¹, 2 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹ e 4 mL de H₂O) (TABELA 3), sendo obtidos nessas condições de preparo valores satisfatórios de recuperação e RSD para todos os elementos analisados, incluindo o ferro. Porém, devido à elevada concentração de HNO₃ nestes digeridos, foi necessária uma diluição das amostras na proporção de 1:1 com água ultrapura, que foram então analisadas por ICP OES com concentração de HNO₃ final de 13 % v v⁻¹.

5.2. Determinação do teor de carbono residual (RCC)

A eficiência do preparo de amostra em meio ácido por radiação micro-ondas também foi estudada. A avaliação dos estudos apresentados na tabela abaixo permite verificar que não existe uma porcentagem de RCC onde é possível inferir com absoluta certeza que não haverá interferências nas análises. O valor percentual (m m⁻¹) obtido nas análises de RCC varia de acordo com as quantidades de reagente e amostra empregados na etapa de preparo, de forma que as comparações são melhor estabelecidas quando as concentrações de carbono são expressas em mg L⁻¹, onde o limite de 5000 mg L⁻¹ é bem definido na literatura (Oliveira *et al.*, 2017; Grindlay *et al.*, 2013; Grindlay *et al.*, 2008). Todos os estudos reportados na TABELA 8 apresentaram eficiência na digestão das matrizes propostas.

TABELA 8 – Avaliação da eficiência de digestão (avaliada em termos de exatidão e teor de carbono residual) de matrizes diversas.

Material analisado	Valores de exatidão (%)	RCC (% w w ⁻¹)	Referência
NIST 1577b, NIST 8435, NIST 1515 e NIST 1570a.	97 - 104	7.79 - 16.6	Gouveia <i>et al.</i> (2001)
NIST 1577b e NIST 8414.	96 - 105	< 15	Bizzi, <i>et al.</i> , (2010)
Amostras de leite e suco.	-	16 - 29	Marques <i>et al.</i> , (2017)
Plantas medicinais e NIST 8435.	90 - 117	< 17	Anschau <i>et al.</i> , (2019)
BCR 62, DORM-2, NIST 1515, NIST 1547, NIST 1567 e NIST 1568.	94 - 105	11 - 40	Wiltse <i>et al.</i> , (2014)
BCR 63, BCR 151, BCR 185 e BCR 186.	81 - 117	8.5 - 38	Pichler, Haase e Knapp (1999)
BCR 414	94 - 99	< 1.5	Hartwig <i>et al.</i> , (2017)
Amostras de fígado e músculo bovino, NIST 1515 e NIST 1577b	71 - 104	5 - 59	Marques <i>et al.</i> , (2015)
Óleos de sementes e nozes	91 - 108	1.2 - 7.5	Ni <i>et al.</i> , (2019)

BCR 62 – folhas de oliveira; BCR 63 – leite em pó; BCR 151 – leite em pó; BCR 185 – fígado bovino; BCR 186 – rim de porco; BCR 414 – plâncton; DORM-2 – músculo de cação; NIST 1515 – folhas de maçã; NIST 1547 – folhas de pêra; NIST 1567 – farinha de trigo; NIST 1568 – farinha de arroz; NIST 1570a – folhas de espinafre; NIST 1577b – fígado bovino; NIST 8414 – músculo bovino; NIST 8435 – leite integral em pó;

Neste trabalho, foram avaliados o teor de carbono residual e o teor de carbono total (TC) nas amostras de sementes e derivados de cânhamo (TABELA 9).

TABELA 9 – Teor de carbono residual (RCC) das sementes de cânhamo e seus derivados após a digestão ácida assistida por radiação microondas (valor médio ± sd, n = 3).

Amostra	SC1	SC2	SD	OL	MA	PR
C total (% m m⁻¹)	49,4 ± 1,4	53,3 ± 0,4	58,8 ± 0,04	-	57,9 ± 0,3	40,4 ± 0,6
C residual (% m m⁻¹)	14,5 ± 0,5	17,5 ± 0,7	22,6 ± 0,8	35,1 ± 1,1	27,3 ± 0,5	7,2 ± 0,1
C residual (mg L⁻¹)	544 ± 13	656 ± 18	848 ± 22	1315 ± 30	1024 ± 12	270 ± 3
C digerido (%)	71	67	62	-	53	82

- Não foi possível realizar a determinação do teor de carbono total para a amostra de óleo de cânhamo (OL), uma vez que esta apresenta-se na forma líquida, incompatível com o equipamento utilizado.

SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo; PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

C digerido foi calculado da seguinte forma:

$$C \text{ digerido (\%)} = \frac{C_{total} - C_{residual}}{C_{total}} \times 100$$

A porcentagem de carbono digerido foi calculada para estimar a quantidade do carbono total que foi mineralizada (convertida a CO₂) no processo de preparo de amostra.

Desta forma é possível inferir que independentemente do tipo de amostra, mais de 50% do teor de carbono original da matriz foi mineralizado.

O maior RCC foi obtido para a amostra de óleo de cânhamo, ainda assim, encontrava-se dentro dos valores alcançados em trabalhos anteriores, que apresentaram bons resultados de exatidão e precisão para amostras com RCC de até 59%. Além disso, o limite estabelecido para a concentração de carbono que começa a interferir na determinação de elementos com energia de ionização elevados (5000 mg L^{-1}) não foi extrapolado, uma vez que a amostra com maior RCC apresentou concentração de carbono equivalente a 1315 mg L^{-1} . Desta forma, foi possível inferir que a digestão empregada para as amostras de alimentos de cânhamo foi eficiente, possibilitando a determinação dos elementos analisados com boa exatidão e precisão.

5.3. Validação dos métodos aplicados nas análises por ICP OES

Todas as curvas analíticas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de determinação (R^2) acima do limite estabelecido pelo INMETRO (2018) ($R^2 > 0,990$). O R^2 indica a variância observada em y, que é explicada pela relação linear. Quanto mais próximo da unidade, melhor explicadas serão as variações de y em função de x pelo modelo.

Foram analisados materiais de referência certificados de matriz vegetal para avaliação dos parâmetros de desempenho exatidão e precisão (TABELA 10).

TABELA 10 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos na determinação do teor de elementos inorgânicos em materiais de referência certificado. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=3.

Folhas de espinafre (SRM 1570a)				
Analito	Valor certificado (mg kg^{-1})	Valor encontrado (mg kg^{-1})	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	15260 \pm 660	15337 \pm 536	101	3,5
K	29000 \pm 260	32187 \pm 770	111	2,4
Mg	-	-	-	-
Na	18210 \pm 230	20256 \pm 463	111	2,3
P	5187 \pm 67	6006 \pm 161	116	2,7
Ba	-	-	-	-
Cd	2,876 \pm 0,058	1,662 \pm 0,021	58	1,3
Cr	-	-	-	-
Cu	12,22 \pm 0,86	14,15 \pm 0,51	116	1,3
Fe	-	-	-	-
Mn	76,0 \pm 1,2	83,6 \pm 3,6	110	5,3
Mo	-	-	-	-
Pb	-	-	-	-
Sr	55,54 \pm 0,50	59,98 \pm 3,02	108	5,0
Zn	82,3 \pm 3,9	91,8 \pm 5,4	112	5,9

Folhas de tomate (SRM 1573a)				
Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	50450±550	53912±1005	107	1,9
K	26760±480	30451±1068	110	3,5
Mg	-	-	-	-
Na	136,1±3,7	134,9±6,8	99	5,0
P	2161±28	2569±87	119	3,4
Ba	-	-	-	-
Cd	1,517±0,027	0,877±0,002	58	0,3
Cr	1,988±0,034	1,624±0,049	82	3,8
Cu	4,7±0,14	3,8±0,05	81	1,8
Fe	367,5±4,3	366,1±11,4	100	0,5
Mn	246,3±7,1	249,4±5,5	101	2,7
Mo	-	-	-	-
Pb	-	-	-	-
Sr	-	-	-	-
Zn	30,94±0,55	31,96±1,28	103	4,0
Folhas de chá verde (GBW 10052)				
Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	12100±300	11753±378	97	3,2
K	15500±700	16895±189	109	1,1
Mg	2200±80	2197±85	100	3,9
Na	-	-	-	-
P	2800±100	3006±66	107	2,2
Ba	41±4	43±1	105	3,5
Cd	0,076±0,004	-	0	-
Cr	0,92±0,2	0,99±0,02	108	2,2
Cu	24±1	26±0,6	108	3,1
Fe	322±23	328±21	102	8,9
Mn	-	-	-	-
Mo	0,11±0,02	-	0	-
Pb	1,6±0,2	-	0	-
Sr	36±2	34±1	95	4,1
Zn	35±2	36±0,6	104	1,7

Como pode ser observado, para a maioria dos experimentos realizados foram obtidos valores de recuperação entre 80 – 120 % e RSD < 10%, em acordo com o preconizado pela ANVISA, Comunidade Europeia e INMETRO. Entretanto, para os elementos Cd, Mo e Pb obtiveram-se recuperações < 80%. Este fato deve-se ao nível de detectabilidade do ICP OES, que não apresenta sensibilidade suficiente para quantificação de alguns analitos em níveis de concentração na ordem de até 20 µg L⁻¹, o que justifica a necessidade do uso do GF AAS nas determinações dos contaminantes As, Cd e Pb nos alimentos de cânhamo em estudo, por apresentar melhor detectabilidade (µg L⁻¹ – ng L⁻¹) em relação ao ICP OES (mg L⁻¹ - µg L⁻¹).

¹). Além disso, os elementos As e V não foram apresentados na tabela por serem encontrados em nível de concentração menores que os LOQ's dos elementos estudados (TABELA 11).

TABELA 11 – Limites de detecção e quantificação dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO₃ 65% m v⁻¹, 2,00 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura.

Analitos	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Ca	0,05	0,16
K	3,02	9,95
Mg	0,03	0,10
P	2,36	7,78
Ag	0,006	0,02
Al	0,16	0,54
As	0,09	0,30
Ba	0,01	0,04
Be	0,02	0,05
Cd	0,02	0,06
Co	0,003	0,01
Cr	0,002	0,007
Cu	0,02	0,05
Fe	0,13	0,44
Li	0,05	0,15
Mn	0,008	0,03
Mo	0,003	0,01
Na	0,25	0,81
Pb	0,32	1,04
Sn	0,03	0,10
Sr	0,01	0,04
V	0,26	0,86
Zn	0,003	0,009

Os valores de LOD e LOQ foram determinados de acordo com as EQUAÇÕES 3 e 4, conforme sugerido por Thomsen, Schatzlein e Mercurio (2003). Estas equações são usadas para esta técnica uma vez que, por se tratar de uma técnica de emissão da radiação eletromagnética, geralmente pode apresentar elevado sinal de fundo, devido às milhares linhas de emissão associadas a cada elemento (interferência espectral), o que geralmente não é observado em técnicas que se baseiam na absorção de radiação. Sendo assim, esta forma de calcular os valores de LOQ gera valores mais próximos ao real (e com maior sensibilidade em relação ao cálculo proposto pela ANVISA), pois leva em consideração o valor de concentração equivalente de fundo (BEC). O BEC é definido como a razão entre os sinais das espécies interferentes e do analito. A presença deste parâmetro permite descontar o sinal de fundo inerente à técnica de emissão, sendo obtido a partir do sinal do branco analítico e de soluções padrão de cada analito estudado. Menores valores de BEC indicam menor contribuição dos interferentes no sinal do analito.

Os teores dos elementos químicos inorgânicos presentes nas amostras foram quantificados e estão apresentados na TABELA 12, estabelecendo a composição química

inorgânica das sementes de cânhamo e de seus derivados. Estes dados também estão apresentados em gráfico de barras (FIGURA 14), possibilitando a melhor visualização dos resultados.

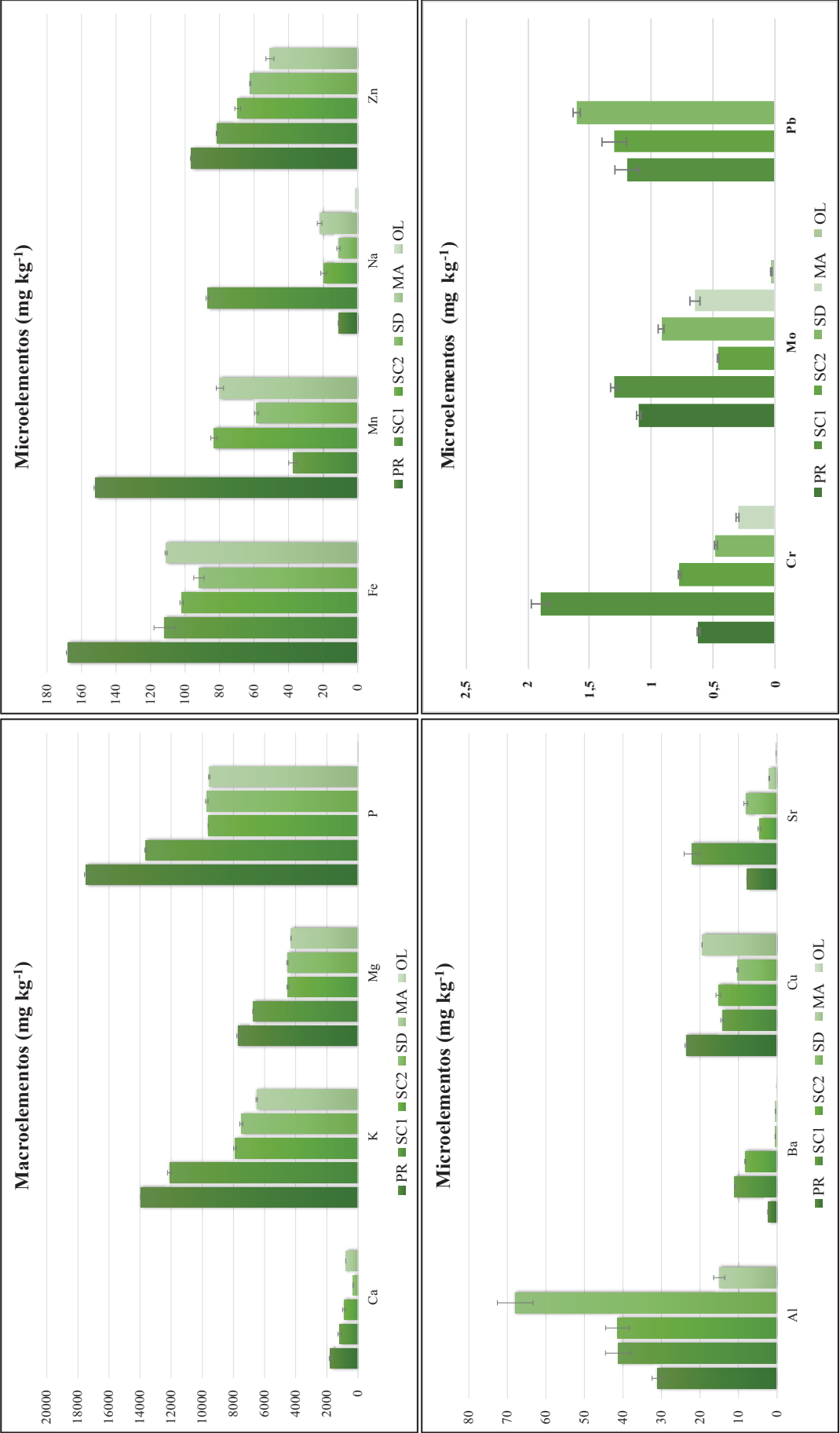
TABELA 12 – Teores dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO₃ 65% m v⁻¹, 2,00 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura (valor médio \pm sd, n = 3).

Macroelementos (mg kg ⁻¹)	SC1	SC2	SD
Ca	1164 \pm 120	900 \pm 87	313 \pm 3
K	12104 \pm 131	7900 \pm 94	7500 \pm 99
Mg	6734 \pm 22	4498 \pm 59	4529 \pm 43
P	13636 \pm 70	9623 \pm 1	9715 \pm 80
Microelementos (mg kg ⁻¹)			
Al	41 \pm 3	41 \pm 3	68 \pm 5
Ba	11,0 \pm 0,01	8,3 \pm 0,1	0,48 \pm 0,03
Cr	1,9 \pm 0,07	0,77 \pm 0,01	0,48 \pm 0,01
Cu	14,2 \pm 0,4	15,2 \pm 0,6	10,2 \pm 0,2
Fe	112 \pm 6	102 \pm 1	92 \pm 3
Mn	38 \pm 2	83 \pm 2	59 \pm 1
Mo	1,3 \pm 0,03	0,46 \pm 0,01	0,92 \pm 0,02
Na	87 \pm 0,9	19,7 \pm 2	11,1 \pm 1,0
Pb	1,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,03
Sr	22 \pm 2	4,6 \pm 0,4	8,1 \pm 0,5
Zn	82 \pm 0,3	70 \pm 2	62 \pm 0,3
Macroelementos (mg kg ⁻¹)	OL	MA	PR
Ca	10,1 \pm 0,8	791 \pm 2	1777 \pm 73
K	< LOQ	6504 \pm 48	13966 \pm 1
Mg	4,9 \pm 0,4	4307 \pm 9	7717 \pm 69
P	39 \pm 3	9556 \pm 46	17480 \pm 90
Microelementos (mg kg ⁻¹)			
Al	< LOQ	15,0 \pm 1,4	31 \pm 1
Ba	0,09 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01	2,4 \pm 0,01
Cr	< LOQ	0,30 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01
Cu	< LOQ	19,5 \pm 0,02	24 \pm 0,3
Fe	< LOQ	111 \pm 0,6	168 \pm 0,8
Mn	0,66 \pm 0,01	80 \pm 2	152 \pm 0,7
Mo	0,03 \pm 0,01	0,65 \pm 0,04	1,1 \pm 0,02
Na	1,4 \pm 0,08	22 \pm 1	11,1 \pm 0,05
Pb	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Sr	0,21 \pm 0,02	2,1 \pm 0,09	7,8 \pm 0,1
Zn	< LOQ	51 \pm 2	96 \pm 0,6

Valores de LOQ: Ca – 0,16 mg kg⁻¹; K – 9,95 mg kg⁻¹; Mg – 0,10 mg kg⁻¹; P – 7,78 mg kg⁻¹; Al – 0,54 mg kg⁻¹; Ba – 0,04 mg kg⁻¹; Cr – 0,007 mg kg⁻¹; Cu – 0,05 mg kg⁻¹; Fe – 0,44 mg kg⁻¹; Mn – 0,03 mg kg⁻¹; Mo – 0,01 mg kg⁻¹; Na – 0,81 mg kg⁻¹; Pb – 1,04 mg kg⁻¹; Sr – 0,04 mg kg⁻¹; Zn – 0,009 mg kg⁻¹.

* SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

FIGURA 14 – Gráficos de barras dos teores dos elementos inorgânicos quantificados por ICP OES nas amostras previamente digeridas em forno de micro-ondas, com 300 mg de amostra, 4,00 mL de HNO₃ 65% m v⁻¹, 2,00 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹ e 14,00 mL de água ultrapura, n = 3.



SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

Os elementos Ag, As, Be, Cd, Co, Li, Sn e V encontravam-se em concentrações abaixo do limite de quantificação (LOQ) nas amostras, sendo os LOQs de: Ag – 0,02 mg kg⁻¹; As – 0,30 mg kg⁻¹; Be – 0,05 mg kg⁻¹; Cd 0,06 mg kg⁻¹; Co 0,01 mg kg⁻¹; Li – 0,15 mg kg⁻¹; Sn – 0,10 mg kg⁻¹ e V – 0,86 mg kg⁻¹.

Pela análise dos resultados foi possível perceber que, em geral, os teores dos analitos são bem menores no óleo de cânhamo, e superiores na proteína de cânhamo. A explicação para este fato está no método de preparo destes alimentos. No preparo do óleo, a semente com casca é prensada a frio, separando o óleo e deixando como resíduo uma massa conhecida como “bolo de sementes”. O óleo passa então por um processo de clarificação, onde ocorre separação de três fases: a fase pesada, onde encontram-se sólidos insolúveis arrastados com o óleo; a fase intermediária, rica em água; e a fase leve, rica em óleo. O óleo é então separado, lavado com solventes polares, e, posteriormente, centrifugado, para finalizar o processo de purificação. Desta forma, uma vez que os analitos em questão são elementos inorgânicos, apresentam maior afinidade pelos solventes polares, garantindo menor teor de minerais no óleo, enquanto este é rico em ácidos graxos essenciais e ácido linoleico. A retirada de metais do óleo é importante para evitar o processo de oxidação deste produto (ANGELOVA, IVANOVA & IVANOV, 2005; BASHIR *et al.*, 2017; ELSON, HYNES & MCNEIL, 1979; SZENTMIHALYI *et al.*, 2002; SZYCZEWSKI *et al.*, 2016).

Já a proteína e a manteiga são preparadas através do “bolo de sementes” produzido após a extração do óleo. Uma vez que grande parte do óleo foi retirado desta massa, os teores dos elementos inorgânicos (por grama) nos alimentos derivados do bolo de sementes, em geral, são superiores àqueles encontrados no óleo e na semente (os quais apresentam alto teor de óleo em sua composição) (HEMPMEDS BRASIL, 2019; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2013; SPOON SUPER ALIMENTOS, 2019).

Este bolo segue diferentes processos para a produção de cada alimento. Na produção da manteiga de cânhamo, o resíduo é triturado, e, em alguns casos, tem adição de manteiga industrial para melhorar a textura, de forma que fique mais parecida com a manteiga convencional. Para produzir a proteína, o resíduo é seco e então moído e peneirado, gerando um concentrado dos minerais, fibras e proteínas (50 % da composição do pó) presentes na semente. Como o bolo é seco para formar a proteína, o teor dos analitos por grama deste alimento é bastante superior àqueles que não passam por esta etapa (HEMPMEDS BRASIL, 2019; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2013; SPOON SUPER ALIMENTOS, 2019).

A quantificação permitiu identificar que os elementos Zn, Mn, Cu e Fe foram encontrados em maior quantidade em relação aos outros micronutrientes, fato este que pode ser explicado pela sua essencialidade ao desenvolvimento das plantas.

O zinco atua como ativador enzimático e na síntese do hormônio de crescimento vegetal; enquanto o manganês controla reações de oxirredução essenciais à fotossíntese e síntese de clorofila. O excesso destes elementos não causa grandes prejuízos às plantas, podendo gerar manchas na parte aérea de plantas jovens, já a ausência pode provocar manchas necróticas (queima das folhas) e redução do crescimento (ESALQ, 2019; NUNES, 2019).

Já o elemento Fe, também micronutriente, atua como ativador enzimático, catalisador na biossíntese de clorofila, no desenvolvimento de troncos e raízes, além de influenciar a fixação de nitrogênio. Sua deficiência gera necrose e queda de folhas, podendo gerar o desfolhamento total; reduz o crescimento da planta e diminui o tamanho de frutos. O excesso não gera toxicidade (ESALQ, 2019; NUNES, 2019).

O cobre também é um micronutriente essencial, entretanto, encontra-se geralmente em baixas concentrações. O cobre possui papel importante em processos de fotossíntese, respiração e fixação de nitrogênio. O excesso deste elemento reduz o crescimento das raízes e parte aérea, provoca deformações e prejudica a absorção de ferro (ESALQ, 2019; NUNES, 2019).

Bário e cromo não são considerados essenciais às plantas, desta forma, devem ser encontrados em baixas concentrações, pois podem levar a redução de crescimento foliar e radicular e morte das plantas (CASTILHOS & GUADAGNIN, 2012; MERLINO, 2013).

Alumínio é altamente tóxico às plantas, devendo ser encontrado em mínimas quantidades. Sua presença causa desintegração do tecido da epiderme, podendo promover o colapso das células. Reduz o crescimento e desenvolvimento de raízes e parte aérea, além de reduzir a absorção de nutrientes. Apesar disso, é um dos metais mais abundante em solos. Quando a água, rica em gás carbônico, entra em contato com o solo, libera o Al^{3+} , que é altamente solúvel em pH abaixo de 5,5. Por isso, comumente encontra-se este metal em produtos derivados de plantas. Entretanto, quando em concentrações elevadas, gera a morte da mesma (MIGUEL *et al.*, 2010).

Dos elementos quantificados, todos encontram-se dentro dos limites máximos de nutrientes em suplementos alimentares (que englobam óleos e farinhas de sementes, bem como as próprias sementes, entre outros alimentos), estabelecido para o grupo populacional

de adultos (> 18 anos, não gestantes ou lactantes), de acordo com as agências ANVISA (2018) e FDA (2016).

Sendo assim, uma estimativa do valor nutricional ao ser humano pela ingestão das sementes de cânhamo e derivados pôde ser realizada a partir dos teores dos analitos (nutrientes) encontrados nesse estudo. Ou seja, a quantidade de nutrientes ingeridos em cada porção (dose) dos alimentos em estudo foi comparada com a dose recomendada por dia, por um adulto não gestante ou lactante (ANVISA, 2018; FDA, 2016).

Os cálculos de ingestão de cada nutriente por dose (indicada pelo fabricante) de suplemento alimentar foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Ingestão} = \text{Concentração do nutriente (mg kg}^{-1}\text{)} \times \text{Dose do alimento (kg)}$$

Onde:

Ingestão = quantidade de nutriente ingerido por dose recomendada pelo fabricante, para cada amostra alimentar;

Concentração (mg kg⁻¹) = concentração do analito determinada nas análises por ICP OES;

Dose do alimento (kg) = valor da massa da porção (dose) recomendada pelo fabricante para o consumo diário de proteína.

*As doses recomendadas pelo fabricante estão especificadas no site de venda, sendo definidas como: 10,1 g para ingestão de sementes com casca, sementes descascadas e óleo de cânhamo; 20,0 g para ingestão de manteiga de cânhamo; e 13,3 g de proteína de cânhamo.

Por exemplo:

$$\text{Ingestão de Mn por dose consumida de proteína} = 152,36 \times 0,0133$$

$$= 2,03 \text{ mg de Mn por dose de proteína ingerida.}$$

Desta forma, tomando como base os valores de ingestão diária recomendados pelas agências ANVISA (2018) e FDA (2016) para cada nutriente, foi possível calcular, a porcentagem nutricional que cada alimento estudado fornece ao indivíduo, denominada na TABELA 13 de “% nutricional”. Estes dados também estão apresentados em gráfico de barras (FIGURA 15)

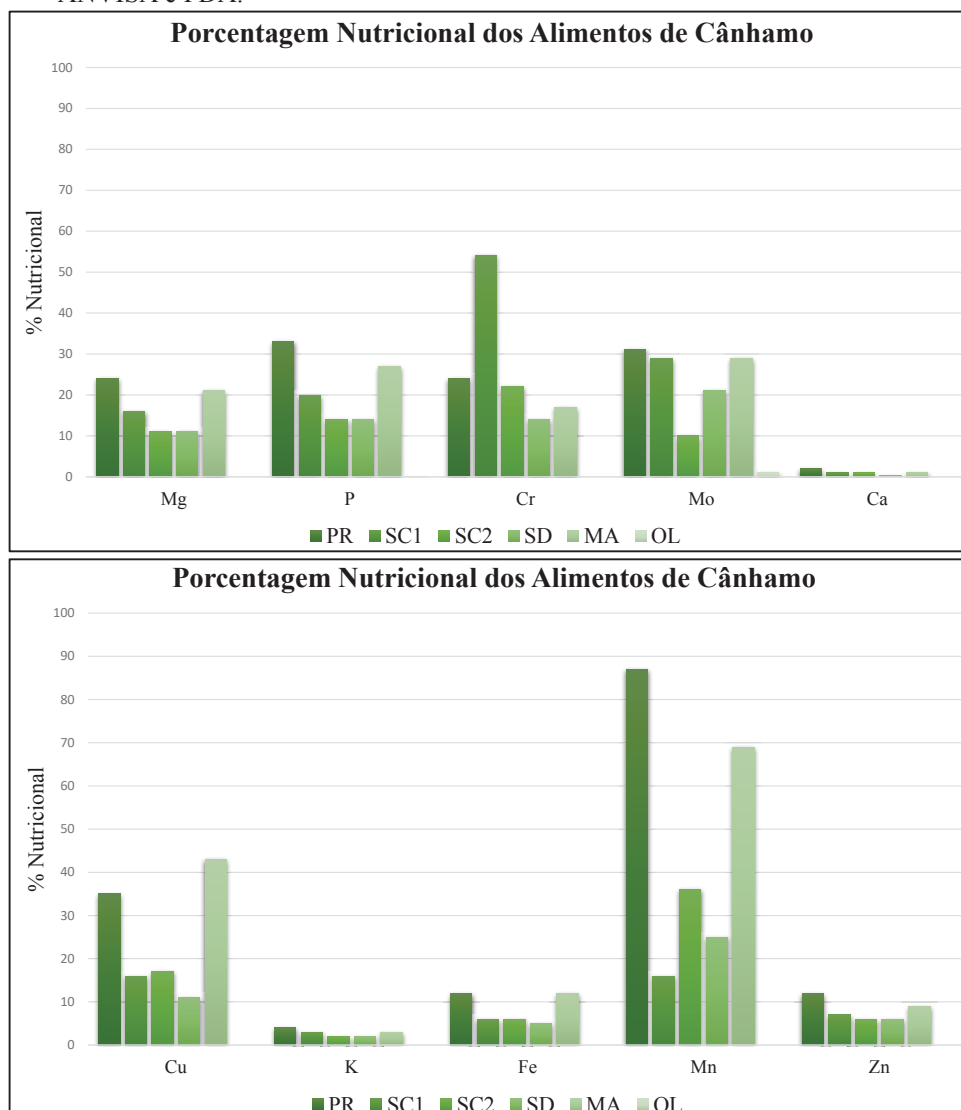
$$\% \text{ de Mn ingerida} = \frac{2,03 \text{ mg}}{2,30 \text{ mg}} \times 100 = 87 \% \text{ do recomendado por dia.}$$

Onde 2,30 é a quantidade de Mn recomendada pelas agências ANVISA (2018) e FDA (2016) a ser ingerida por dia, para adultos (> 18 anos), não gestantes ou lactantes.

TABELA 13 – Avaliação nutricional dos alimentos em estudo. Porcentagem calculada em relação à porção de cada alimento, tendo como base os valores recomendados de ingestão diária.

Nutriente	Ingestão recomendada por dia	SC1	SC2	SD	OL	MA	PR
% Nutricional (referente à quantidade total recomendada por dia)							
Ca	1200 mg	1	1	0,3	-	1	2
K	4700 mg	3	2	2	-	3	4
Mg	420 mg	16	11	11	-	21	24
P	700 mg	20	14	14	0,1	27	33
Cr	35 µg	54	22	14	-	17	24
Cu	900 µg	16	17	11	-	43	35
Fe	15 mg	6	6	5	-	12	12
Mn	2,3 mg	16	36	25	-	69	87
Mo	45 µg	29	10	21	1	29	31
Zn	11 mg	7	6	6	-	9	12

FIGURA 15 – Avaliação nutricional dos alimentos em estudo. Porcentagem calculada em relação à porção de cada alimento tendo como base os valores recomendados de ingestão diária determinados pela ANVISA e FDA.



SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

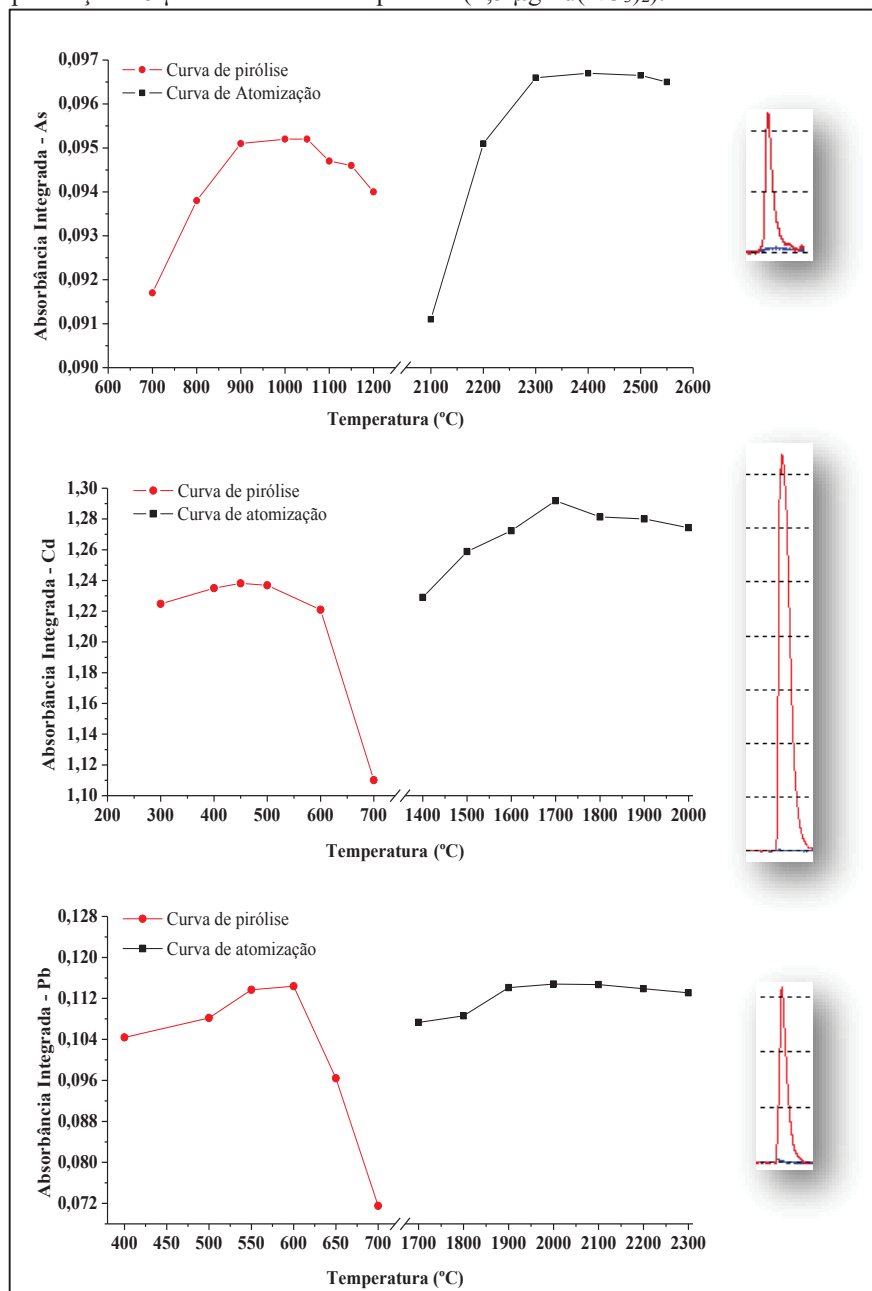
Estes resultados confirmam os relatos de elevado valor nutricional dos alimentos estudados (JOHNSON, 2017; KORKMAZ *et al.*, 2010; OOMAH *et al.*, 2002; SMALL, 2016), que fornecem, em porções de 10,1 – 20,0 g por dia, quantidade considerável dos nutrientes necessários ao bom funcionamento/manutenção do organismo humano. Apesar do óleo de cânhamo ser o produto mais consumido dentre os estudados, este foi caracterizado como o alimento de menor valor nutricional, fornecendo percentual quase nulo dos nutrientes necessários, enquanto a proteína apresentou o maior valor nutricional inorgânico, seguida por manteiga e sementes, o que pode ser explicado pelos procedimentos industriais aos quais estes alimentos são submetidos, como já comentados anteriormente.

5.4. Tratamento Ácido para as Análises por GF AAS

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de métodos simples para a quantificação de As, Cd e Pb nas amostras de estudo, e que possam ser facilmente aplicados em análises de rotina.

As temperaturas de pirólise e atomização foram estudadas para cada analito empregando inicialmente solução de referência contendo $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, Cd e Pb em HNO_3 1% v v⁻¹. O estudo das temperaturas de pirólise e atomização em GF AAS normalmente é feito de forma univariada. Sendo assim, inicialmente fez-se a otimização dos parâmetros instrumentais (temperaturas de pirólise e de atomização) dessa forma, buscando conhecer as faixas das temperaturas a serem empregadas nas amostras de estudo, conforme pode ser observado na FIGURA 16.

FIGURA 16 – Curvas de pirólise e atomização para As, Cd e Pb. As análises foram desenvolvidas usando alíquotas de 20 µL de solução padrão de cada analito em meio ácido (HNO_3 1% v v⁻¹), na presença de 5 µL de modificador químico (2,5 µg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$).



FONTE: a autora.

*Os sinais transientes em vermelho são os sinais do analito e, em azul, os sinais transientes de fundo, indicando o melhor SBR para Cd, Pb e As, respectivamente.

As temperaturas de pirólise e atomização são específicas para cada analito, e dependem não somente do seu ponto de ebulição, mas também da forma como estão ligados na matriz, do tipo de matriz onde está inserido, bem como dos tipos de ácidos empregados na etapa de preparo, tais como ácidos oxidantes – HNO_3 , complexantes – HCl , dentre outros. Além disso, podem variar de acordo com o uso de modificador químico, bem como o tipo do modificador, dentre outros fatores. Sendo assim, não foi possível conhecer as temperaturas de pirólise e atomização previamente ao desenvolvimento do método. Estas

são conhecidas ao estabelecer a curva de pirólise e atomização, específicas para cada analito em cada amostra, onde é possível inferir uma faixa ideal para a temperatura de pirólise, e outra para a atomização (SCHLEMMER & RADZIUK, 1999).

As curvas obtidas para as temperaturas de pirólise e atomização indicam que inicialmente a matriz interferente ainda não foi eliminada de forma eficiente, gerando redução do sinal analítico, até que se atinge um ponto máximo de absorbância, que indica a melhor eficiência de temperatura de pirólise e atomização no método, seguida por uma nova queda na curva, referente à volatilização do analito e consequente redução do sinal analítico, devido às elevadas temperaturas aplicadas.

Os valores de absorbância máximos para As, Cd e Pb (FIGURA 16) foram obtidos usando temperaturas de pirólise de 1050, 500 e 600 °C, com temperaturas de atomização de 2400, 1700 e 2000 °C, respectivamente. Estas condições forneceram sinais bem definidos e simétricos, com valores de SBR satisfatórios para os analitos em meio ácido, e estão de acordo com valores já reportados na literatura. Bakirdere *et al.* (2013) encontraram temperaturas de pirólise (600, 280 e 380 °C) e atomização (2300, 1800 e 2000 °C) para os analitos As, Cd e Pb respectivamente, em águas engarrafadas e de torneira usando Ni como modificador. Giacomelli *et al.* (2004) usaram Ir e Rh como modificadores permanentes em estudos do tratamento térmico de As, Cd e Pb (em meio de HNO₃ 1% v v⁻¹) por GFAAS. As temperaturas de pirólise e atomização encontradas foram: 1400 e 2300 °C para As, 700 e 1500 °C para Cd e 900 e 1900 °C para Pb, respectivamente.

A avaliação da razão sinal analítico/sinal de fundo mostrou que o menor valor de SBR foi obtido no método de As, indicando menor sensibilidade para este analito quando comparado ao Cd e Pb. Assim, este elemento foi escolhido para desenvolver o planejamento fatorial para o preparo de amostra nas amostras de estudo.

Quanto ao uso do modificador químico Welz e Sperling (1999) sugerem o uso de Pd-Mg como modificador universal. Entretanto, também reportam a alta eficiência somente do Pd na quantificação de vários elementos. Neste estudo, o modificador químico Pd-Mg foi empregado nas análises, no entanto, observou-se que a própria matriz das amostras estudadas atua como um modificador químico (CAL-PIETRO *et al.*, 2002; CÓRDOBA & GARCIA, 1991; ROBLES & ALLER, 1995). Desta forma, o uso de Mg(NO₃)₂ como modificador não melhorou a qualidade analítica dos resultados em relação aos parâmetros de exatidão e precisão. Assim, o Pd(NO₃)₂ foi empregado juntamente com o teor de magnésio naturalmente presente na amostra, atuando como um excelente modificador químico, principalmente para as determinações de As e Cd.

A partir dos resultados obtidos no estudo univariado das temperaturas de pirólise e atomização, foi possível aplicar os valores encontrados para uma análise mais criteriosa das condições instrumentais do GF AAS, empregando, nesse caso, o planejamento fatorial fracionário, no intuito de se promover uma triagem das variáveis que realmente são significativas para a obtenção de condições ótimas de análise.

Em experimentos prévios no GFAAS, todas as amostras digeridas em micro-ondas para as análises por ICP OES foram analisadas sob as condições estabelecidas no estudo univariado de temperatura de pirólise e atomização, de forma a verificar a amostra com maior sinal de fundo, ou seja, a amostra que poderia apresentar maiores problemas nas análises. A proteína de cânhamo (PR) foi a amostra empregada nos estudos subsequentes por ser considerada a matriz mais complexa, levando-se em consideração sua composição química inorgânica, que apresenta os maiores teores de fósforo e potássio, que são altamente interferentes para quantificação de arsênio no GFAAS, gerando elevados sinais de fundo para este analito.

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a viabilidade da otimização dos parâmetros instrumentais referentes à separação térmica do analito na matriz (temperatura de pirólise) e quantificação (temperatura de atomização) juntamente com o preparo de amostras em meio ácido. Desta forma, foram empregados nesses estudos planejamentos fatoriais que permitiram avaliar esse conjunto de fatores, isto é, as condições instrumentais associadas ao preparo de amostras. Esperava-se encontrar uma condição de análise em que o preparo de amostras fosse o mais simples possível, mas que fornecesse condições reacionais favoráveis para o tratamento térmico da matriz pelo forno de grafite, obtendo-se resultados analíticos com adequada confiabilidade. O planejamento fatorial fracionário com ponto central 2^{6-1} (TABELAS 14 e 15) desenvolvido permitiu identificar as variáveis significativas e suas possíveis interações (FIGURA 17), que não são levadas em conta numa abordagem de otimização univariada, sendo evitadas perdas no desempenho do método analítico em desenvolvimento.

TABELA 14 – Planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} desenvolvido para a otimização do preparo de amostras e análise pelo GF AAS. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).

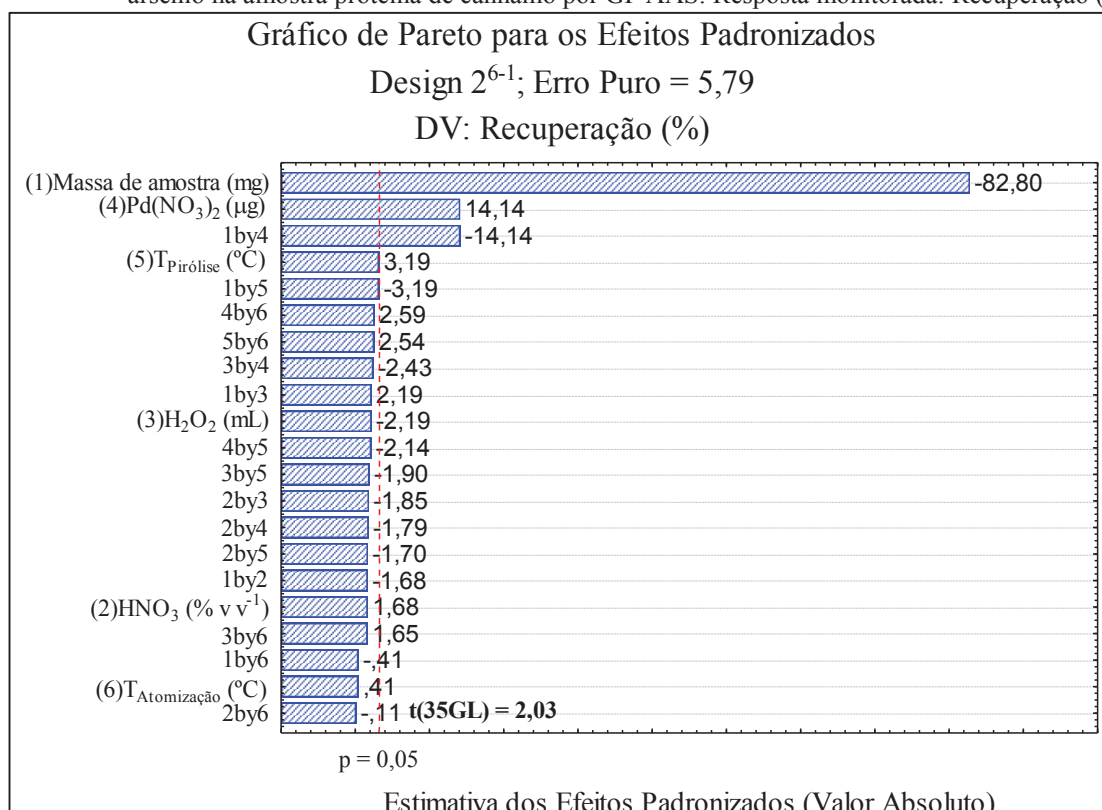
Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-1)	Central	Máximo (+1)
H₂O₂ (% v v⁻¹)	0	1	2
HNO₃ (% v v⁻¹)	2	4	6
Massa de amostra (mg)	10	30	50
Pd(NO₃)₂ (µg)	1	4	7
Pirólise (°C)	800	950	1100
Atomização (°C)	2100	2250	2400

TABELA 15 – Planilha do planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} desenvolvido para a otimização do preparo de amostras e análise pelo GF AAS. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).

Experimento	Massa de amostra (mg)	HNO ₃ (% v v ⁻¹)	H ₂ O ₂ (mL)	Pd(NO ₃) ₂ (µg)	T _{Pirólise} (°C)	T _{Atomização} (°C)	Recuperação (%)
1	10	2	0	1	800	2100	51,4
2	50	2	0	1	800	2400	0
3	10	6	0	1	800	2400	52,5
4	50	6	0	1	800	2100	0
5	10	2	2	1	800	2400	50,3
6	50	2	2	1	800	2100	0
7	10	6	2	1	800	2100	61,2
8	50	6	2	1	800	2400	0
9	10	2	0	7	800	2400	80,0
10	50	2	0	7	800	2100	0
11	10	6	0	7	800	2100	87,9
12	50	6	0	7	800	2400	0
13	10	2	2	7	800	2100	77,6
14	50	2	2	7	800	2400	0
15	10	6	2	7	800	2400	80,7
16	50	6	2	7	800	2100	0
17	10	2	0	1	1100	2400	60,3
18	50	2	0	1	1100	2100	0
19	10	6	0	1	1100	2100	68,6
20	50	6	0	1	1100	2400	0
21	10	2	2	1	1100	2100	59,8
22	50	2	2	1	1100	2400	0
23	10	6	2	1	1100	2400	63,1
24	50	6	2	1	1100	2100	0
25	10	2	0	7	1100	2100	85,4
26	50	2	0	7	1100	2400	0
27	10	6	0	7	1100	2400	92,1
28	50	6	0	7	1100	2100	0
29	10	2	2	7	1100	2400	87,1
30	50	2	2	7	1100	2100	0
31	10	6	2	7	1100	2100	68,7
32	50	6	2	7	1100	2400	0
33 (C)	30	4	1	4	950	2250	22,8
34 (C)	30	4	1	4	950	2250	22,7
35 (C)	30	4	1	4	950	2250	24,7
36 (C)	30	4	1	4	950	2250	18,9

(C) – Ponto central

FIGURA 17 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação da triagem das variáveis para a determinações de arsênio na amostra proteína de cânhamo por GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).



Neste planejamento, as variáveis significativas foram massa de amostra (efeito negativo de -83) e quantidade de modificador químico (efeito positivo de +14), indicando melhores recuperações nos níveis mínimo e máximo, respectivamente.

Uma vez que a matriz em estudo é de alta complexidade, os resultados matemáticos/estatísticos obtidos estavam em concordância com o esperado do ponto de vista químico, já que menor massa de amostra representa menor quantidade de matriz interferente na solução, e maior quantidade de modificador químico promove maior estabilidade do analito, o que, para o As, é significativamente relevante, levando-se em consideração sua elevada volatilidade (WELZ & SPERLING, 1999).

Massas de amostra de aproximadamente 10 mg forneceram valores de recuperação maiores que 90%. Entretanto, massas de maior valor mostraram recuperações menores que 80%. Assim, 10 mg foi a massa escolhida para o preparo de amostras. Massas menores que esta não foram empregadas, pois poderiam promover maiores erros de pesagem, devido à precisão da balança analítica disponível.

Satisfatórios valores de recuperação foram alcançados na ausência de H₂O₂, evidenciado pelo efeito negativo deste na porcentagem de recuperação, assim, esta variável foi excluída dos estudos posteriores. Desta forma, um novo planejamento fatorial 2^4 com

ponto central foi aplicado (TABELAS 16 e 17), a fim de se avaliar a interação somente das variáveis que apresentaram potencial influência para quantificação de As na proteína de cânhamo (FIGURA 18).

TABELA 16 – Planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central desenvolvido para a otimização do preparo de amostra associado ao tratamento térmico no GF AAS para determinação de arsênio. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).

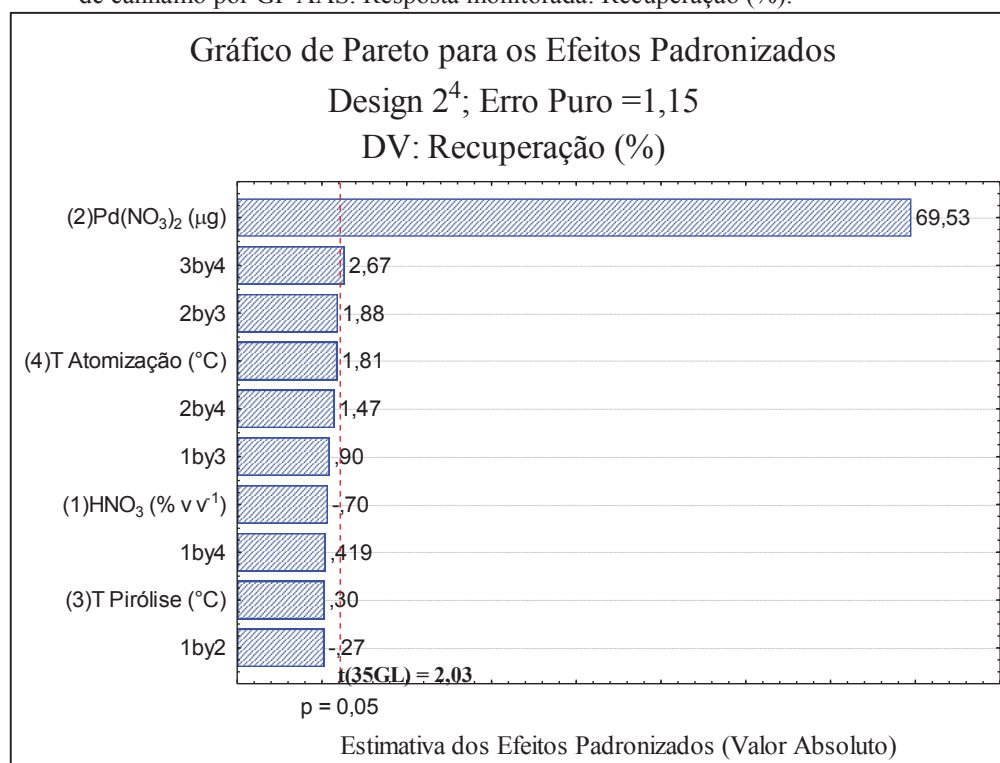
Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-1)	Central	Máximo (+1)
HNO_3 (% v v ⁻¹)	4	6	8
$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (µg)	3	5	7
Pirólise (°C)	900	1000	1100
Atomização (°C)	2200	2300	2400

TABELA 17 – Planilha do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central desenvolvido para a otimização do preparo de amostra associado ao tratamento térmico no GF AAS para determinação de arsênio. Amostra – proteína de cânhamo. Resposta monitorada: Recuperação (%).

Experimento	Replicata	HNO_3 (% v v ⁻¹)	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (µg)	T _{Pirólise} (°C)	T _{Atomização} (°C)	Recuperação (%)
1	1	4	3	900	2200	61,6
2	1	8	3	900	2200	60,2
3	1	4	7	900	2200	93,4
4	1	8	7	900	2200	92,2
5	1	4	3	1100	2200	62,2
6	1	8	3	1100	2200	62,7
7	1	4	7	1100	2200	92,7
8	1	8	7	1100	2200	95,2
9	1	4	3	900	2400	61,9
10	1	8	3	900	2400	62,7
11	1	4	7	900	2400	93,8
12	1	8	7	900	2400	92,4
13	1	4	3	1100	2400	60,8
14	1	8	3	1100	2400	61,2
15	1	4	7	1100	2400	94,6
16	1	8	7	1100	2400	94,8
17 (C)	1	6	5	1000	2300	89,3
18 (C)	1	6	5	1000	2300	86,7
19	2	4	3	900	2200	62,5
20	2	8	3	900	2200	61,7
21	2	4	7	900	2200	92,9
22	2	8	7	900	2200	90,1
23	2	4	3	1100	2200	62,9
24	2	8	3	1100	2200	62,4
25	2	4	7	1100	2200	93,9
26	2	8	7	1100	2200	93,5
27	2	4	3	900	2400	64,3
28	2	8	3	900	2400	64,7
29	2	4	7	900	2400	95,2
30	2	8	7	900	2400	95,8
31	2	4	3	1100	2400	61,3
32	2	8	3	1100	2400	60,4
33	2	4	7	1100	2400	95,0
34	2	8	7	1100	2400	94,0
35 (C)	2	6	5	1000	2300	84,7
36 (C)	2	6	5	1000	2300	85,2

(C) – Central point

FIGURA 18 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação nas determinações de arsênio na amostra proteína de cânhamo por GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).



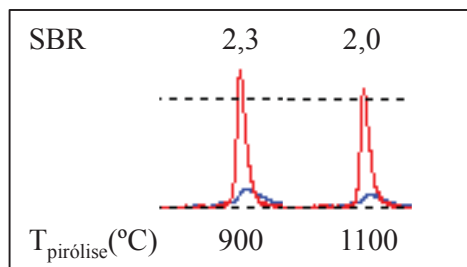
FONTE: a autora

Os resultados indicaram duas variáveis significativas, que foram a quantidade de modificador químico (efeito positivo de +69) e a interação entre atomização e pirólise (efeito positivo de +3). Quando 7 µg de modificador foi usada, independente dos níveis dos outros fatores, recuperações maiores que 90% foram alcançadas. A elevada necessidade de modificador nas determinações de arsênio era esperada, uma vez que a literatura reporta dificuldades na quantificação deste elemento (CASTRO & ALLER, 2003; CHAKRABORTI & IRGOLIC, 1984; EPA, 2007; PERAMAKI, PESONEN & PIISPANEN, 2000). Maiores quantidades de modificador foram estudadas de forma univariada, entretanto a perda de sensibilidade associada a este aumento impediu que estas quantidades fossem aplicadas nas determinações (WELZ & SPERLING, 1999).

Considerando a elevada complexidade da matriz e seu potencial interferente, constatou-se que uma quantidade significativa de modificador deve ser empregada na quantificação de As nas amostras de cânhamo. Contudo, a presença de modificador químico contribui para maiores limites de detecção (LOD's), uma vez que, em sua presença, os sinais analíticos são geralmente mais largos, de forma que a absorbância integrada seja menor. Desta forma, a fim de se encontrar uma condição de equilíbrio entre a sensibilidade do método proposto e a quantidade de modificador necessária para a adequada atomização do As, um estudo sistemático foi realizado variando-se as temperaturas de pirólise e de

atomização em pequenos incrementos, empregando nesses estudos o parâmetro SBR e valores de recuperação como indicadores da melhor condição instrumental (FIGURA 19).

FIGURA 19 – Variação dos valores de SBR na avaliação da interação das temperaturas de pirólise e de atomização no planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central aplicado para o elemento arsênio.

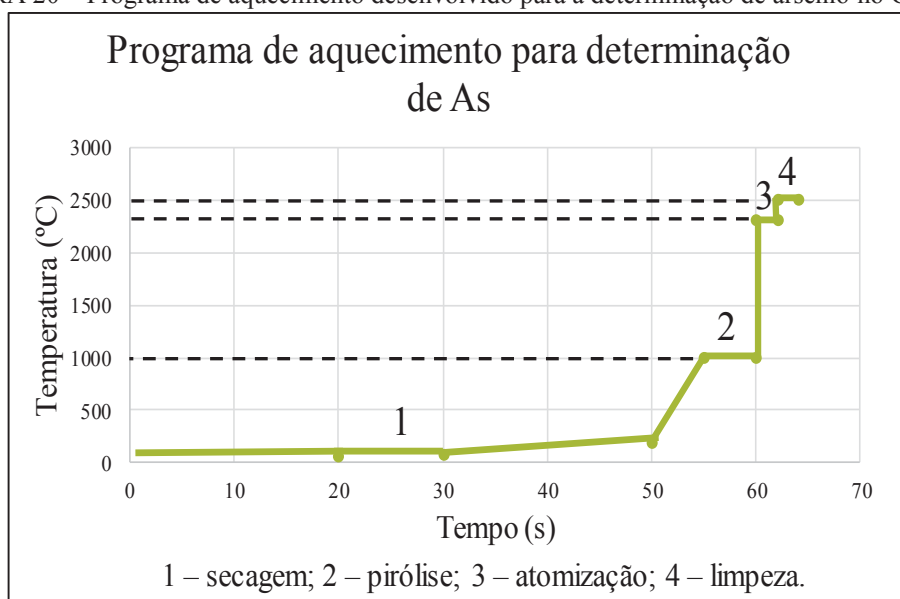


Recuperações obtidas maiores que 90% para as duas condições.

FONTE: a autora

Como pode ser observado na FIGURA 19, apesar de garantir um pequeno aumento na porcentagem de recuperação, maiores temperaturas promoveram perda de sensibilidade, indicado pelo valor menor do SBR. Sendo assim, valores de temperaturas de pirólise (1000 °C) e de atomização (2300 °C) foram escolhidos como condições instrumentais ótimas de análise, uma vez que forneceram valores de recuperação para As maior que 93%, além de promover maior sensibilidade quando comparado às temperaturas mais elevadas. O programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de arsênio é mostrado na FIGURA 20.

FIGURA 20 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de arsênio no GF AAS.



FONTE: a autora.

A concentração de HNO_3 escolhida para o preparo de amostra foi de 4% v v⁻¹. Maiores concentrações de ácido apresentaram maior sinal de fundo, diminuindo significativamente o SBR. Além disso, é reportado que elevadas concentrações de HNO_3 apresentam maior viscosidade e tensão superficial, afetando a formação reprodutível do tamanho da gota (referente ao volume de 20 μL da amostra inserida no tubo de grafite). Estas interferências físicas produzem mudanças na dispersão da solução durante as etapas de secagem e atomização, afetando a acurácia do método e promovendo maiores valores de RSD (MINAMISAWA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010).

O estudo inicial para o arsênio permitiu a definição das condições químicas para o preparo de amostras a se empregar para todos os analitos, entretanto, as condições do tratamento térmico no GF AAS são específicas para cada elemento (análise monoelementar). Desta forma houve a necessidade de se empregar um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central para o estudo das condições instrumentais de análise no GF AAS para a determinação de Cd e Pb em sementes de cânhamo e seus derivados (TABELA 18). A otimização dessas condições instrumentais foi investigada para a amostra de proteína de cânhamo devido aos motivos citados anteriormente, e as recuperações obtidas no planejamento são mostradas na TABELA 19.

TABELA 18 – Planejamento fatorial completo (2³) com ponto central aplicado para a otimização das condições instrumentais para a quantificação de Cd e Pb no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).

Variável	Níveis (Cd)			Níveis (Pb)		
	Mínimo (-1)	Central	Máximo (+1)	Mínimo (-1)	Central	Máximo (+1)
Pd(NO₃)₂ (μg)	0,5	1,0	1,5	0,0	1,0	2,0
Pirólise (°C)	450	600	750	450	600	750
Atomização (°C)	1500	1600	1700	1800	1900	2000

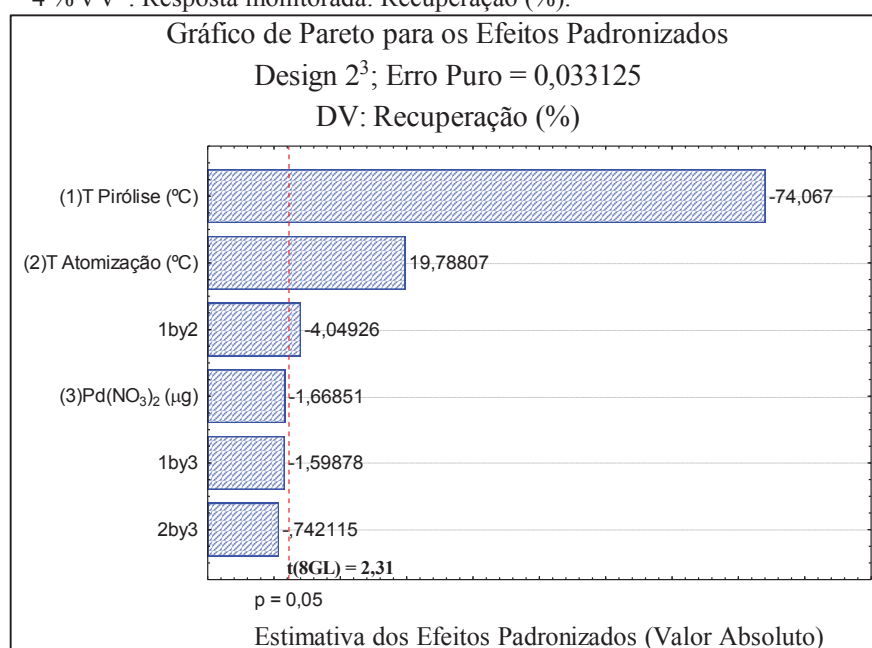
TABELA 19 – Planilha do planejamento fatorial completo (2^3) com ponto central aplicado para a otimização das condições instrumentais para a quantificação de Cd no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).

Experimento	Replicata	T _{Pirólise} (°C)	T _{Atomização} (°C)	Pd(NO ₃) ₂ (μg)	Recuperação (%)
1	1	450	1500	0,5	94,0
2	1	750	1500	0,5	78,0
3	1	450	1700	0,5	100,5
4	1	750	1700	0,5	81,3
5	1	450	1500	1,5	94,7
6	1	750	1500	1,5	76,9
7	1	450	1700	1,5	99,9
8	1	750	1700	1,5	81,0
9 (C)	1	600	1600	1,0	97,6
10 (C)	1	600	1600	1,0	97,9
11	2	450	1500	0,5	94,7
12	2	750	1500	0,5	77,9
13	2	450	1700	0,5	100,0
14	2	750	1700	0,5	81,5
15	2	450	1500	1,5	95,8
16	2	750	1500	1,5	76,3
17	2	450	1700	1,5	100,8
18	2	750	1700	1,5	81,1
19 (C)	2	600	1600	1,0	97,8
20 (C)	2	600	1600	1,0	97,5

(C) – Central point

O Cd apresenta elevada volatilidade. Por esta razão, na ausência de modificador químico as soluções padrão de cádmio $15 \mu\text{g L}^{-1}$ não geraram sinal analítico, entretanto, a partir de uma adição mínima de modificador ($0,5 \mu\text{g}$) satisfatórios valores de recuperação foram obtidos. O gráfico de Pareto (FIGURA 21) mostra os efeitos atribuídos para cada variável e suas interações.

FIGURA 21 – Gráfico de Pareto para a variável recuperação nas determinações de cádmio em meio de HNO₃ 4 % v v⁻¹. Resposta monitorada: Recuperação (%).



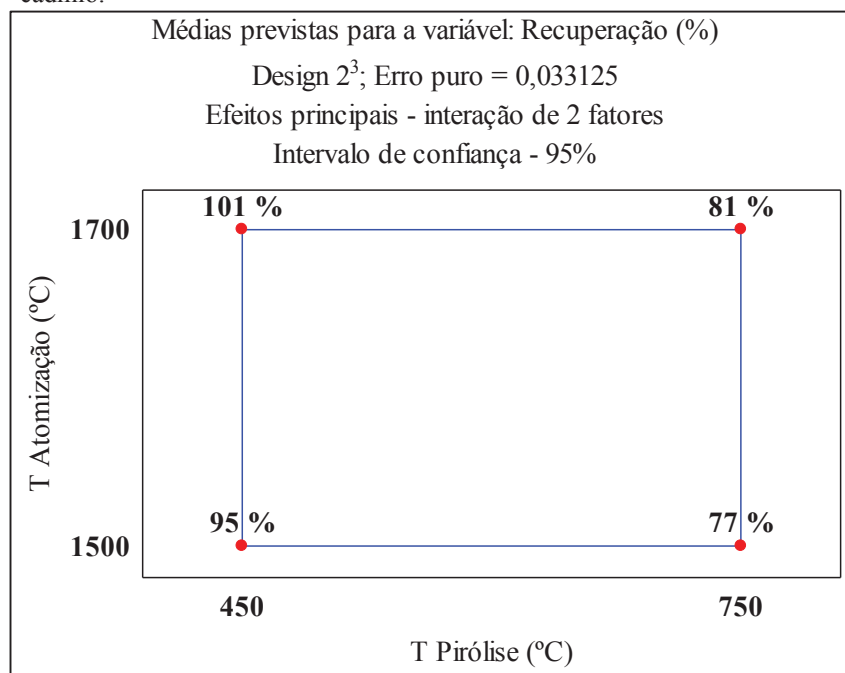
FONTE: a autora

As boas respostas obtidas neste planejamento, mesmo com adições mínimas de modificador, devem-se ao fato de que a própria amostra atua como modificador químico da matriz. Este fato pôde ser observado quando, na ausência de modificador químico, a amostra retornou excelentes valores de SBR, enquanto a solução padrão de cádmio não retornou nenhum sinal analítico. Isso ocorre pois o Mg atua como um excelente estabilizante de matriz na etapa de pirólise, bem como o Pd. Como as amostras em estudo apresentam elevado teor de Mg em sua composição, as sementes e derivados de cânhamo analisadas atuaram por si só como estabilizante do analito no tubo de grafite. Entretanto, devido à ausência do sinal analítico da solução de referência, uma adição mínima de modificador fez-se necessária. (BORGES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2010; WELZ & SPERLING, 1999).

A quantidade de modificador neste planejamento não foi significativa, contudo, pode-se observar que o efeito para esta variável indicou melhores valores de recuperação para o nível mínimo, condição onde menores valores de sinais de fundo foram obtidos, garantindo melhor sensibilidade ao método proposto.

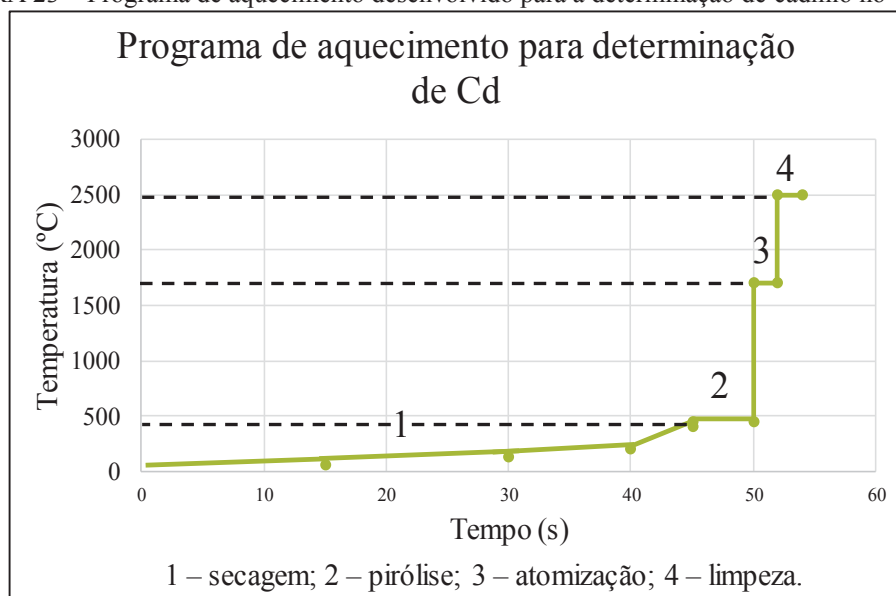
As variáveis significativas foram temperatura de pirólise e atomização, com efeitos indicando para os níveis mínimo e máximo, respectivamente. Welz e Sperling (1999) reportam temperatura máxima de pirólise de 800 °C e de atomização (1500-1700 °C) para a quantificação de cádmio por GF AAS na presença de modificadores químicos, geralmente (Pd-Mg). Como pode ser observado na FIGURA 22, elevadas temperaturas de pirólise (750 °C) forneceram recuperação para Cd em torno de 80%, enquanto menores temperaturas (450 °C) permitiram alcançar recuperações em torno de 100%. Desta forma, as seguintes condições instrumentais: temperatura de pirólise de 450 °C, temperatura de atomização de 1700 °C e 0,5 µg de Pd(NO₃)₂ promoveram recuperações para Cd em amostras de proteína de cânhamo em torno de 100%, sendo estas as condições escolhidas para as análises das amostras de cânhamo. O programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de cádmio é mostrado na FIGURA 23.

FIGURA 22 – Diagrama de médias previstas para a variável dependente (recuperação). O gráfico mostra a interação entre as variáveis temperaturas de pirólise e de atomização no planejamento para o cádmio.



FONTE: a autora.

FIGURA 23 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de cádmio no GF AAS.



FONTE: a autora.

Para a quantificação do chumbo, um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central também foi aplicado nas amostras de proteína de cânhamo. A temperatura de pirólise de 450 °C na ausência de modificador químico promoveu recuperações em torno de 93% e 120% com a adição de 2 µg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, independentemente do valor da temperatura de atomização. Pirólise de 750 °C sem Pd proporcionou recuperações de 75%, com a adição de modificador (2 µg) recuperações de 94% foram alcançadas. Os experimentos do ponto

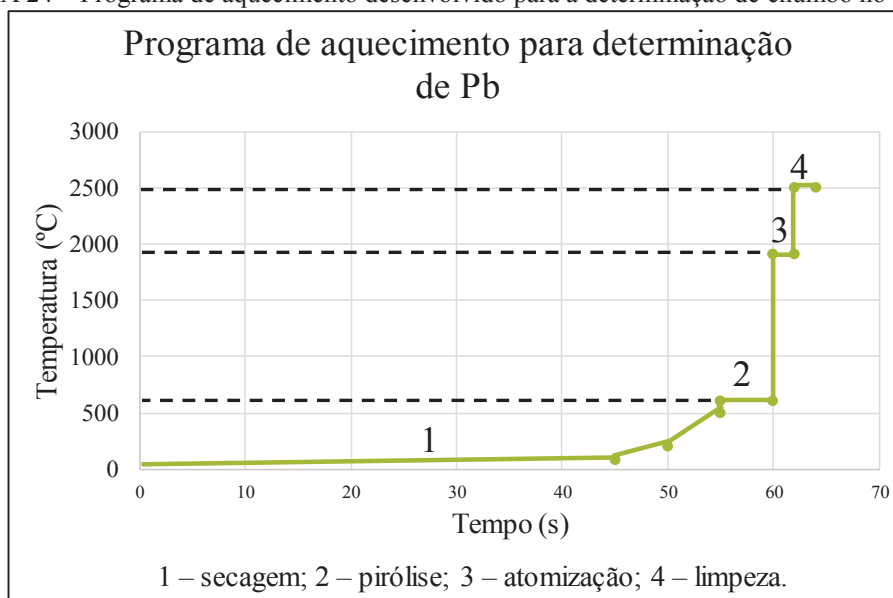
central (600 e 1900 °C de pirólise e atomização respectivamente, e 1 ug de Pd) retornaram valores de recuperação de 107%.

Essa recuperação razoavelmente elevada na presença de modificador químico pode ser devida à estabilização de espécies químicas presentes na matriz, tornando-as refratárias e atomizando-as juntamente com o Pb, provavelmente causando interferência espectral para a quantificação de Pb nas amostras de proteína de cânhamo.

O planejamento realizado norteou as condições instrumentais e reacionais. Novos experimentos foram realizados mantendo as temperaturas de pirólise e atomização do ponto central (600 e 1900 °C) na ausência de um modificador químico. Esses estudos possibilitaram recuperações de cerca de 99%, sendo essas condições escolhidas para as determinações de Pb.

Sendo assim, as condições instrumentais de análise obtidas foram: temperatura de pirólise e atomização de 600 e 1900 °C, não havendo a necessidade de se empregar modificador químico. O programa de aquecimento desenvolvido para o chumbo é mostrado na FIGURA 24.

FIGURA 24 – Programa de aquecimento desenvolvido para a determinação de chumbo no GF AAS.



FONTE: a autora.

Os programas de aquecimento desenvolvidos no GF AAS para a quantificação de As, Cd e Pb estão também reportados na (TABELA 20).

TABELA 20 – Programas de aquecimento desenvolvidos no GF AAS para determinação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e seus derivados.

	Temperatura (°C)			Tempo (s)			Modo de aquecimento	Vazão de gás (L min ⁻¹)
	As	Cd	Pb	As	Cd	Pb		
Secagem	50	50	70	20	15	45	Rampa	0,1
	70	120	200	10	15	5	Rampa	1,0
	190	200	-	20	10	-	Rampa	1,0
Pré-pirólise	1000	400	500	5	5	5	Rampa	1,0
Pirólise	1100	450	600	5	5	5	Hold	1,0
Atomização	2300	1700	1900	2	2	2	Hold	0,0
Limpeza	2500	2500	2500	2	2	2	Hold	1,0

5.5. Emprego da Solubilização alcalina das sementes de cânhamo.

O tratamento alcalino foi avaliado como um método de preparo de amostras alternativo ao tratamento ácido, levando em consideração as facilidades de manuseio e sua capacidade já bem estabelecida de solubilização de matriz vegetal (NÓBREGA *et al.*, 2006; ORESTE *et al.*, 2013). Para isso, um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central foi desenvolvido, empregando 10 mg de amostra de proteína de cânhamo, e composto pelas seguintes variáveis: tempo (10, 20 e 30 minutos), concentração de TMAH (0,10, 0,55 e 1,0 % m v⁻¹) e temperatura de solubilização (50, 75 e 100 °C) (TABELA 21).

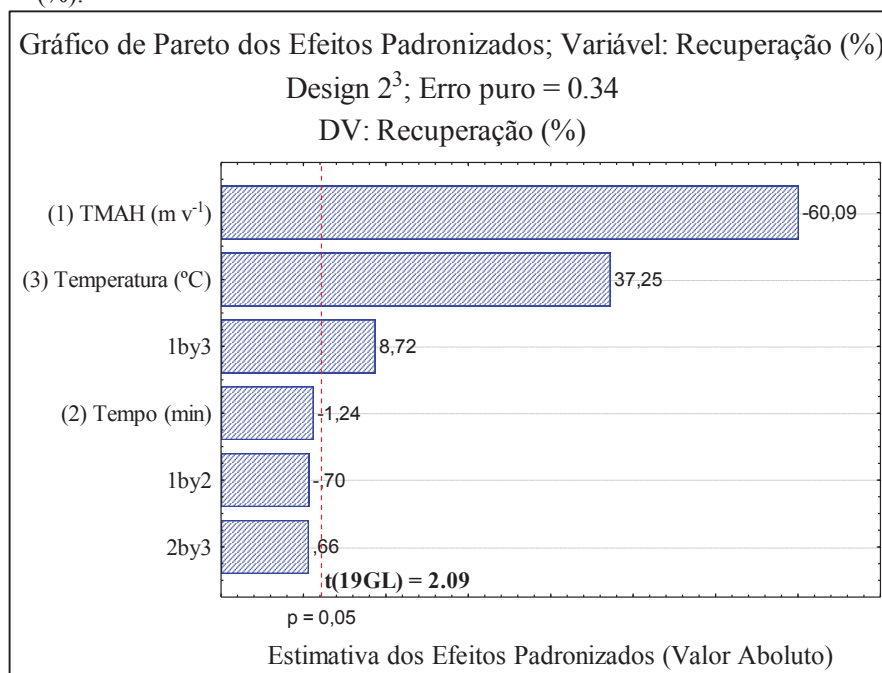
TABELA 21 – Planilha do planejamento fatorial completo (2³) com ponto central aplicado para a otimização do preparo de amostra para a quantificação de As (solubilização alcalina) no GF AAS. Resposta monitorada: Recuperação (%).

Experimento	Replicata	TMAH (% m v ⁻¹)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Recuperação (%)
1	1	0,10	10	50	92,1
2	1	1,00	10	50	71,8
3	1	0,10	30	50	92,1
4	1	1,00	30	50	71,2
5	1	0,10	10	100	100,1
6	1	1,00	10	100	85,9
7	1	0,10	30	100	99,9
8	1	1,00	30	100	85,2
9 (C)	1	0,55	20	75	89,8
10 (C)	1	0,55	20	75	88,7
11	2	0,10	10	50	91,7
12	2	1,00	10	50	72,7
13	2	0,10	30	50	91,5
14	2	1,00	30	50	72,4
15	2	0,10	10	100	100,4
16	2	1,00	10	100	84,6
17	2	0,10	30	100	100,2
18	2	1,00	30	100	85,0
19 (C)	2	0,55	20	75	87,9
20 (C)	2	0,55	20	75	88,4

(C) – Central point

O gráfico de Pareto obtido (FIGURA 25) permitiu uma melhor visualização dos resultados para a quantificação de As nas amostras de estudo. Vale mencionar aqui, que o programa de aquecimento empregado no GF AAS foi o mesmo já otimizado para o preparo de amostras em meio ácido, conforme reportado na Tabela 20.

FIGURA 25 – Gráfico de Pareto para a variável dependente recuperação para a quantificação de As em sementes de cânhamo por GF AAS, em meio de TMAH. Resposta monitorada: Recuperação (%).



FONTE: a autora.

De acordo com a representação dos efeitos apresentada no diagrama de Pareto (FIGURA 25), a concentração de TMAH exibe um significativo efeito negativo (-60), o que indica maiores recuperações de As com o uso de baixas concentrações deste agente. Trata-se de um resultado esperado, em razão do elevado teor de carbono do TMAH ((CH₃)₄NOH) poder gerar interferências nas análises por GF AAS, além de aumentar o sinal de fundo e, consequentemente, diminuir os valores de SBR (CAMPOS, *et al.*, 2018; GHISI *et al.*, 2011; KRUG & ROCHA, 2016; SAVIO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 1999; NÓBREGA *et al.*, 2006).

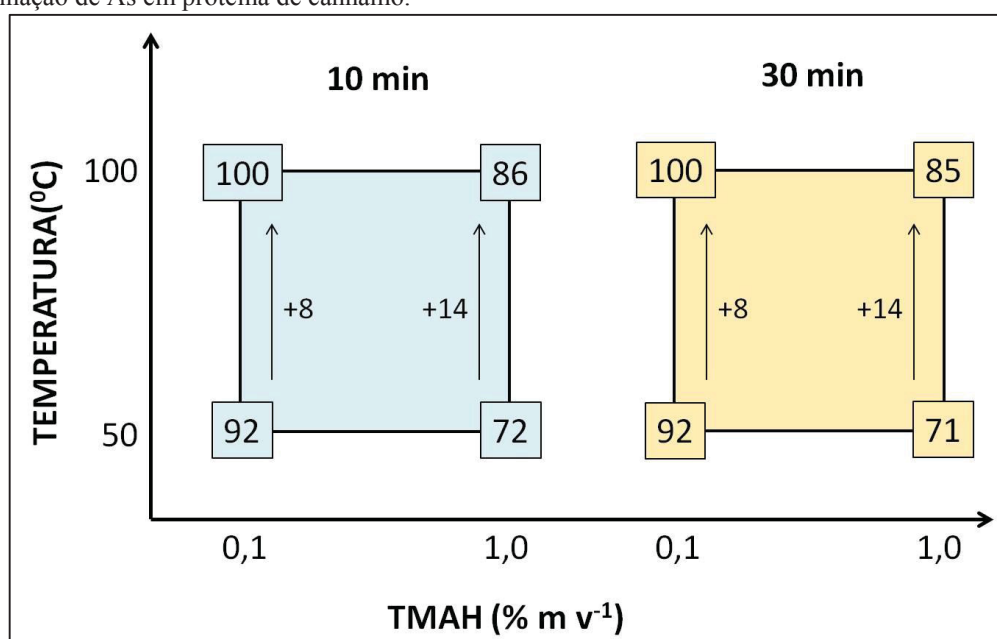
A temperatura mostra um importante efeito positivo (39), indicando que melhor eficiência de extração pode ser alcançada com o uso de maiores temperaturas, o que é consistente com a literatura. A este respeito, é importante salientar que temperaturas mais elevadas não foram avaliadas neste planejamento, para evitar prejuízos na capacidade extrativa do TMAH, que degrada em temperaturas próximas a 135 °C (EPA 2010).

De acordo com estes resultados, as melhores condições de tratamento estão representadas pelo uso da menor concentração de TMAH e da maior temperatura, com

praticamente nenhuma influência do tempo. Nestas condições (experimentos 5, 7, 15 e 17) recuperações da ordem de 100% foram observadas, o que atesta a elevada eficiência do processo de extração.

O gráfico de Pareto também indicou um efeito de segunda ordem entre as variáveis concentração de TMAH e temperatura, o qual pode ser melhor visualizado nas representações geométricas apresentadas na FIGURA 26. De acordo com esta representação, quando a temperatura de tratamento é elevada de 50 para 100 °C, na presença de baixas concentrações de TMAH, a recuperação se eleva 8 pontos percentuais, enquanto quando esta modificação é introduzida na presença de elevadas concentrações de TMAH a recuperação se eleva 14 pontos percentuais, independentemente do tempo de tratamento. Esta disparidade evidencia um efeito de segunda ordem, que neste caso indica um efeito mais pronunciado da temperatura em processos realizados na presença de elevadas concentrações de TMAH.

FIGURA 26 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de segunda ordem apresentados pelo planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do preparo de amostras (solubilização alcalina) para determinação de As em proteína de cânhamo.



É importante mencionar que os estudos em meio alcalino foram conduzidos em forno micro-ondas única e exclusivamente para que a temperatura, que tem um efeito muito significativo para este planejamento como já bem elucidado na literatura, fosse finamente controlada, o que não é possível em chapa de aquecimento. Entretanto, após o estudo do planejamento, os estudos foram repetidos em chapa de aquecimento e os mesmos resultados foram alcançados, reduzindo os custos associados ao uso do equipamento micro-ondas.

Para os cálculos de recuperação, as mesmas condições instrumentais e níveis de fortificação já definidos para o tratamento ácido foram seguidas, de forma a avaliar as diferentes estratégias de preparo de amostras aqui estudadas.

Vale salientar que para a quantificação de arsênio, foi possível reduzir significativamente a quantidade de modificador químico, empregando 3 µg de Pd(NO₃)₂ ao invés dos 7 µg quando em meio ácido. Desta forma, houve uma notável melhora na detectabilidade do método, como indicado pelos parâmetros LOD e LOQ (TABELA 22). O que se deve a capacidade do TMAH de estabilizar o analito, agindo como o próprio modificador químico (KATAOKA *et al.*, 2008). Entretanto, este mecanismo não é bem elucidado na literatura.

Nas determinações de cádmio e chumbo, as recuperações obtidas ficaram em torno de 5 – 10% menores do que aquelas obtidas para o tratamento ácido das amostras. Esta redução nos valores de recuperação pode estar associada a interferências devidas à quantidade de carbono presente no TMAH (53% da composição total), que gera um aumento do teor de carbono nas solubilizações em estudo. Apesar desta pequena redução, as curvas analíticas em meio ácido e alcalino apresentaram sensibilidades muito similares (TABELA 22), o que indica que qualquer um dos meios estudados pode ser aplicado aos estudos desenvolvidos, confirmando a robustez dos métodos propostos.

5.6. Validação dos Métodos Desenvolvidos no GFAAS

5.6.1. Avaliação dos Parâmetros de Desempenho (Figuras de Mérito)

Linearidade, exatidão, precisão, LOD e LOQ foram avaliados nesse estudo. A linearidade foi estabelecida pela análise da regressão de mínimos quadrados dos resultados obtidos pela preparação de curvas de calibração de cada analito com seis níveis de concentração e seis réplicas de cada nível (ANEXO 2). A adequação dos dados foi estabelecida pelo coeficiente de determinação (R^2), que indica a proporção de variação na variável dependente, que é determinada pela variável independente. A linearidade foi considerada aceitável quando R^2 foi superior a 0,990, bem como em relação à significância da regressão (Média Quadrática da Regressão (MQR) / Média Quadrática dos Resíduos (MQR) >>> F_{tab}) e aleatoriedade dos resíduos. Os valores de LOD e LOQ foram calculados utilizando as razões de 3 e 10 vezes o desvio padrão da prova em branco, respectivamente, e o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica (TABELA 22) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018; THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

TABELA 22 – Parâmetros das Curvas Analíticas de Calibração para quantificação de As, Cd e Pb em sementes de cânhamo e seus derivados.

	Meio	Parâmetros da curva analítica	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
As	Ácido*	$y = -0,0020 + 0,0035x$	1,00 – 3,00	0,9980	0,31	0,93
	Ácido**	$y = 0,0018 + 0,0050x$	0,60 – 3,00	0,9992	0,19	0,57
	Alcalino	$y = 0,0003 + 0,0047x$	0,60 – 3,00	0,9990	0,20	0,61
Cd	Ácido	$y = 0,0062 + 0,1331x$	0,05 – 2,00	0,9993	0,01	0,04
	Alcalino	$y = 0,0053 + 0,1233x$	0,05 – 2,00	0,9991	0,01	0,04
Pb	Ácido	$y = 0,0030 + 0,0048x$	0,40 – 3,00	0,9991	0,13	0,38
	Alcalino	$y = 0,0027 + 0,0045x$	0,40 – 3,00	0,9987	0,14	0,42

*Curva de calibração analítica desenvolvida para As em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ com 7 μg de modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; ** Curva de calibração analítica desenvolvida para As em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ com 3 μg de modificador de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$;

Para as determinações de arsênio, três curvas analíticas foram construídas em diferentes meios (em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ empregando 7 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, e em HNO_3 1% v v⁻¹ e TMAH 0,1 % m v⁻¹ empregando 3 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$). As duas curvas analíticas, sendo a primeira em meio ácido e a segunda em meio de TMAH, ambas contendo 3 μg de modificador foram construídas a fim de se avaliar as interferências do efeito de matriz na sensibilidade do método proposto. As curvas de calibração mostraram sensibilidades semelhantes para os dois meios estudados para As, indicando a possibilidade do emprego de curvas analíticas em meio ácido para quantificação de As por calibração externa. Ambas as curvas apresentaram resíduos aleatórios, homocedásticos e independentes.

Entretanto, a curva analítica em meio ácido contendo 7 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ mostrou-se menos sensível quando comparada às curvas obtidas com 3 μg , obtendo-se nesse caso um valor de LOQ (0,93 $\mu\text{g g}^{-1}$) maior quando comparado ao valor de LOQ para o método desenvolvido com TMAH (0,57 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Para as quantificações de As, Cd e Pb foi observado que as curvas analíticas em meio ácido e meio alcalino apresentaram sensibilidades semelhantes. Estes resultados indicam a possibilidade do uso das duas curvas para quantificação de As, Cd e Pb nas amostras de cânhamo, mostrando que as condições instrumentais junto com o tratamento térmico, bem como suas interações cuidadosamente estudadas, promoveram condições ideais de análise combinando os diferentes meios reacionais, permitindo alcançar resultados precisos.

Desta forma, o preparo alcalino foi empregado na quantificação de As, Cd e Pb devido ao nível de concentração em que o arsênio se encontrava nas amostras estudadas, onde um método com maior detectabilidade foi requerido. Entretanto, em análises de amostras com nível de concentração elevados, a melhor sensibilidade fornecida pelo método do TMAH para As não se faz necessária, de forma que os métodos desenvolvidos em meio ácido seriam suficientes para a quantificação.

A exatidão foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados e por experimentos de adição e recuperação da amostra de proteína de cânhamo fortificada, que foram realizados em três níveis de concentração dentro da faixa da curva analítica. Para esses experimentos, a amostra foi mantida previamente em contato com os analitos As, Cd e Pb durante um mês sob refrigeração, a fim de se estabelecer uma possível interação entre analito/matriz, de modo a mimetizar uma amostra naturalmente contaminada. Para o As, todos os CRMs disponíveis no laboratório continham teor abaixo do limite de quantificação do método proposto ($0,57 \mu\text{g g}^{-1}$). Desta forma, a exatidão foi avaliada apenas por experimentos de adição e recuperação. Os valores de recuperação obtidos foram considerados aceitáveis estando dentro do intervalo de 80-120% (TABELAS 23 e 24). A precisão do método foi determinada pelos valores de RSD obtidos a partir de seis análises em cada nível de concentração. Para cada analito foram avaliados três níveis de concentração, conforme pode ser observado na TABELA 24 (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018; THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

TABELA 23 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos na determinação do teor de Cd e Pb em materiais de referência certificado. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=6.

	Valor de referência ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Recuperação (%)		RSD (%)	
	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb
Folha de tomate	1,517 \pm 0,027	-	1,317 \pm 0,021	-	87	-	1,6	-
Folhas de espinafre	2,876 \pm 0,058	-	2,880 \pm 0,101	-	100	-	3,5	-
Chá verde	0,076 \pm 0,004	1,600 \pm 0,200	0,072 \pm 0,002	1,592 \pm 0,028	94	99	2,8	1,8

Os resultados para arsênio não são mostrados pois seu teor no CRM encontrava-se abaixo do LOQ ($0,57 \mu\text{g g}^{-1}$) do método proposto.

TABELA 24 – Avaliação da exatidão e precisão para os métodos desenvolvidos por experimentos de adição e recuperação para a determinação de As, Cd e Pb em proteínas de cânhamo por GF AAS. Os resultados estão expressos como: valor médio \pm sd, n=6.

	Valor Adicionado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
As	1,00	0,95 \pm 0,03	95	3,2
	2,00	1,96 \pm 0,05	98	2,6
	3,00	2,96 \pm 0,05	99	1,7
Cd	0,05	0,047 \pm 0,003	94	6,4
	1,00	0,99 \pm 0,01	99	1,0
	2,00	1,96 \pm 0,05	98	2,6
Pb	0,40	0,39 \pm 0,01	98	2,6
	1,50	1,45 \pm 0,06	97	4,1
	3,00	2,88 \pm 0,12	96	4,2

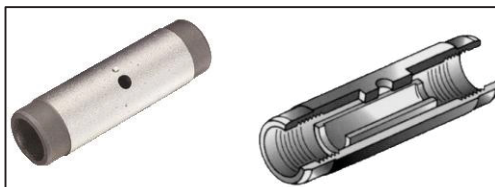
A proteína de cânhamo empregada para os experimentos de adição/recuperação apresentou baixo teor de cádmio ($0,071 \mu\text{g g}^{-1}$), no entanto, esse valor foi descontado nos cálculos da recuperação.

Os valores de recuperação obtidos estão todos dentro da faixa considerada aceitável pelas agências reguladoras (80 - 120%). Os testes de recuperação de arsênio foram realizados em meio de TMAH, enquanto cádmio e chumbo foram realizados em meio de HNO_3 , por serem os respectivos métodos com maior sensibilidade.

5.6.2. Avaliação da Sensibilidade do Método Proposto Empregando o Uso da Plataforma de L'vov nas Análises Químicas.

Nesses estudos, empregou-se um tubo de grafite pirolítico com a plataforma de L'vov (FIGURA 27) a fim de se verificar se o emprego desse aparato tão bem discutido e fundamentado na literatura realmente poderia promover significativa melhora na qualidade analítica dos resultados, além de melhorar a sensibilidade do método desenvolvido.

FIGURA 27 - Tubo de grafite com aquecimento longitudinal com plataforma de L'vov integrada ao tubo de grafite.

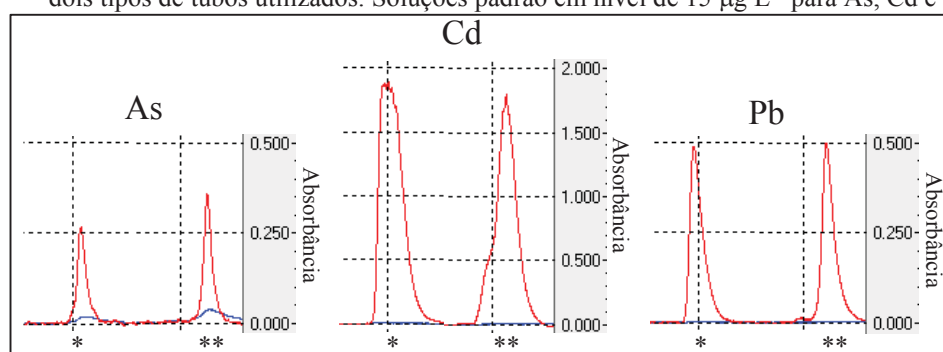


FONTE: Adaptado de PERKINELMER (2019).

Vale mencionar que o uso de tubos de grafite com plataforma de L'vov é uma das recomendações de trabalho no GF AAS (condições STPF). É importante mencionar também que todos os métodos analíticos foram desenvolvidos empregando tubos de grafite sem a plataforma de L'vov, e que essa parte do estudo tem como objetivo avaliar a eficiência desse aparato nas análises químicas, empregando nesse caso, as mesmas condições de preparo de amostras estudadas nesse trabalho. Nesses estudos, o parâmetro SBR foi empregado como um indicador das condições reacionais e instrumentais, permitindo inferir tanto na qualidade analítica dos resultados como também na sensibilidade do método.

Portanto, foram realizadas análises das amostras de proteína de cânhamo previamente fortificadas para o mesmo nível de concentração das soluções padrão de As, Cd e Pb no nível de $15 \mu\text{g L}^{-1}$, as quais também foram empregadas nesse estudo, como soluções de referência. A FIGURA 28 mostra os sinais transientes obtidos para ambos os tubos utilizados.

FIGURA 28 – Sinais transientes obtidos para os analitos As, Cd e Pb na avaliação do parâmetro SBR para os dois tipos de tubos utilizados. Soluções padrão em nível de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ para As, Cd e Pb.



FONTE: a autora.

* - Sinais transientes de As, Cd e Pb $15 \mu\text{g L}^{-1}$ no forno sem plataforma; ** - Sinais transientes de As, Cd e Pb $15 \mu\text{g L}^{-1}$ no forno com plataforma de L'vov.

Os valores do parâmetro SBR foram calculados pela razão entre o sinal analítico e o sinal de fundo obtidos nas análises supracitadas, conforme a EQUAÇÃO 5 abaixo:

$$\text{Equação 5: } SBR = \frac{\text{Absorbância do analito} - \text{Absorbância de fundo}}{\text{Absorbância de fundo}}$$

A partir dos valores de SBR obtidos foi possível também avaliar a detectabilidade do método, conforme resultados apresentados na TABELA 25.

TABELA 25 – Valores encontrados para os parâmetros SBR obtidos a partir das análises empregando tubo de grafite sem e com plataforma de L'vov para a quantificação dos analitos As, Cd e Pb em amostras de proteína de cânhamo e derivados por GF AAS. Resultados expressos como: valor médio \pm sd, $n = 3$.

Analito	Forno sem plataforma de L'vov	Forno com plataforma de L'vov
	SBR	SBR
As	$5,6 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,4$
Cd	$224 \pm 9,9$	$190 \pm 7,4$
Pb	$106 \pm 3,1$	$108 \pm 2,5$

Para os dados da Tabela 25, os valores de “ $t_{\text{calculado}}$ ” foram calculados pelo método do teste t de comparação entre médias (EQUAÇÃO 6) (ALVES, 2017), considerando o número de medidas (n) = 3.

$$\text{EQUAÇÃO 6: } t_{\text{calculado}} = \frac{X_x - X_y}{\sigma_a \sqrt{(1/n_x + 1/n_y)}} ; \sigma_a = \sqrt{\frac{(n_x - 1)\sigma_x^2 + (n_y - 1)\sigma_y^2}{n_x + n_y - 2}}$$

Os valores de $t_{\text{calculado}}$ para As, Cd e Pb foram: $t_{\text{calculado(As)}} = 1,47$; $t_{\text{calculado(Cd)}} = 0,35$; $t_{\text{calculado(Pb)}} = 0,26$. Quando $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ as médias não diferem significativamente entre

si. O valor de t_{tabelado} foi obtido através da tabela t de student, com intervalo de confiança de 95%, sendo este igual a 2,78.

Analisando os valores de SBR e os “teste t” aplicados, pode-se verificar que nenhum dos valores de SBR (para As, Cd ou Pb) diferem significativamente entre si, ou seja, não houve um acréscimo significativo na detectabilidade dos métodos analíticos desenvolvidos empregando tubos de grafite sem e com plataforma. Uma possível explicação para este fenômeno é que os estudos sistemáticos desenvolvidos empregando os planejamentos fatoriais permitiram alcançar uma região ótima e eficiente em termos de condições reacionais/instrumentais de quantificação para cada analito, possibilitando um tratamento térmico da amostra e condições de atomização ideais, e que a inserção da plataforma de L'vov não alterou de forma significativa a melhora dessas condições já proporcionadas nesse estudo. O uso das condições STPF e seus benefícios são consolidados na literatura para eliminação de interferências espectrais, entretanto, alguns autores relatam a necessidade de otimização do preparo de amostras e condições instrumentais para eliminação de interferências matriciais, onde a condição de STPF pode falhar.

May & Brumbaugh (1982) relataram que o uso da plataforma reduziu a sensibilidade do método desenvolvido para determinar chumbo em tecido de peixe quando comparado ao método proposto sem a plataforma.

Felipe-Sotelo *et al.* (2004) avaliaram a determinação de molibdênio em cinzas de carvão comparando o desempenho de tubos de grafite pirolítico com e sem a plataforma L'vov. Os resultados indicaram que o melhor desempenho, redução do efeito de memória, precisão e sensibilidade foram alcançados usando o tubo sem plataforma. A possível explicação para esse fenômeno é que, na presença da plataforma a formação de ligações estáveis entre o modificador e o analito na superfície da parede do tubo é prejudicada, gerando perdas na atomização do analito. Os autores também consideram que a menor taxa de aquecimento nas determinações utilizando o tubo com a plataforma L'vov promove a atomização incompleta do analito.

Slavin & Manning (1980) relataram a eficiência do uso da plataforma de L'vov para corrigir interferências na matriz desde que os sinais de fundo produzidos pelos interferentes sejam pequenos o suficiente para serem corrigidos pela lâmpada de deutério.

Assim, apesar do uso da plataforma de L'vov ser bem consolidado na literatura, neste estudo pode-se observar que quando os métodos analíticos são cuidadosamente estabelecidos, levando-se em consideração o parâmetro SBR como guia para o tratamento da amostra de acordo com as condições instrumentais, um método robusto é alcançado.

Portanto, o tubo com plataforma de L'vov não foi utilizado para outras análises, visto que o tubo sem plataforma forneceu resultados adequados, além de apresentar um custo menor em relação ao primeiro (valores dos tubos de grafite fornecidos pela Shimadzu em setembro de 2019: sem plataforma – R\$ 575,27; com plataforma – R\$ 1177,55).

Os valores de LOD e LOQ ($\text{LOD } (\mu\text{g g}^{-1})$ – As: 0,19; Cd: 0,01; Pb: 0,13 e $\text{LOQ } (\mu\text{g g}^{-1})$ – As: 0,57; Cd: 0,036; Pb: 0,38) corroboram os resultados obtidos nestes experimentos, onde o método desenvolvido para o cádmio foi aquele com melhor detectabilidade, seguido pelo chumbo e então arsênio.

5.6.3. Quantificação dos analitos As, Cd e Pb nas sementes de cânhamo e seus derivados.

Todas as amostras de cânhamo foram analisadas pelos métodos propostos. Os resultados para quantificação de As, Cd e Pb são mostrados na TABELA 26.

TABELA 26 – Concentrações de As, Cd e Pb nas sementes de cânhamo e derivados, determinadas pelos métodos propostos por GF AAS (valor médio \pm sd, $n = 3$).

Amostra	As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)
SC1	< LOQ	0,058 \pm 0,003	1,071 \pm 0,009
SC2	< LOQ	< LOQ	1,234 \pm 0,003
SD	< LOQ	< LOQ	1,384 \pm 0,001
PR	< LOQ	0,071 \pm 0,002	< LOQ
MA	< LOQ	< LOQ	< LOQ
OL	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Valores de LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$): 0,57 (As), 0,036 (Cd), 0,38 (Pb).

FAO/WHO – limite máximo ($\mu\text{g g}^{-1}$) de 0,1 para As e Cd e 0,2 μg para Pb.

ANVISA e Comunidade Europeia – limite máximo ($\mu\text{g g}^{-1}$) de 0,3 para As, 0,1 para Cd e 0,2 para Pb.

SC1 e SC2 – Sementes com casca; SD – Semente sem casca; OL – Óleo de cânhamo PR – Proteína de cânhamo; MA – Manteiga de cânhamo.

Os resultados obtidos foram comparados com os limites máximos estabelecidos pelas agências: Organização para Alimentação e Agricultura / Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), Comunidade Europeia e ANVISA (ANVISA, 2013; FAO/WHO, 1972; JORNAL OFICIAL DA COMUNIDADE EUROPEIA, 2006). A FAO/WHO determina o nível máximo de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As e Cd e 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. A ANVISA e a Comunidade Europeia estabeleceram os limites de 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Assim, pode-se verificar que as amostras de sementes de cânhamo, com casca ou descascados, estão acima dos limites máximos permitidos para Pb pelos três órgãos reguladores, mas seguras em relação ao consumo de Cd. Entretanto, não é possível estabelecer o nível de segurança do consumo destes alimentos em relação à As, uma vez que o limite máximo estabelecido pelas agências reguladoras para este contaminante é de 0,1 -

0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, enquanto o limite de quantificação obtido para o método proposto foi de 0,57 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Vários autores relatam a dificuldade na determinação de arsênio por GF AAS. As maiores interferências estudadas para este elemento são causadas por alumínio, fosfato e sulfato. Quando arsênio se encontra em baixas concentrações, a presença de fosfatos, sulfatos, sódio e potássio em nível de concentração de poucos mg L^{-1} podem gerar supressão do sinal analítico do As. A quantificação desse analito, dentre os três estudados, é particularmente dificultada devido ao seu baixo comprimento de onda (193,7 nm), que gera maiores problemas espectrais não específicos e dispersão de luz por componentes da matriz durante o processo de atomização (CASTRO & ALLER, 2003; CHAKRABORTI, *et al.*, 1984; EPA, 2007; PERAMAKI, *et al.*, 2000).

Segundo Riley (1982) *apud* BETTINELLI, *et al.* (1988), a presença do alumínio (193,5 nm), mesmo em baixa concentração gera sérias interferências na determinação do arsênio, uma vez que as linhas espectrais destes elementos são muito próximas. Nesta situação, a correção de fundo por fonte contínua não é capaz de resolver o problema, o que é facilmente resolvido pela correção por efeito Zeeman (CASTRO & ALLER, 2003; MARTINSEN, *et al.*, 1988).

Neste trabalho a linha de emissão do arsênio foi alterada de 193,7 para 197,3 e 228,8 (linhas secundárias do arsênio). Entretanto, mesmo em outros comprimentos de onda, não foi possível a obtenção de melhores resultados na determinação desse analito, o que pode ser explicada pela natural diminuição da sensibilidade nos comprimentos de onda secundários do As, inferindo que a presença do alumínio pode não ser o principal fator para a diminuição da sensibilidade na linha analítica do As.

Welz *et al.* (1988) estudaram o efeito de diversos cátions e ânions na determinação de arsênio por GF AAS. Os resultados mostraram que o ânion fosfato é aquele de maior influência no sinal do As, sendo classificado como interferência química. Na presença de 5 mg L^{-1} de PO_4^{3-} , o sinal analítico do arsênio sofreu uma redução de 75% em relação ao sinal obtido na ausência de fosfato. Independente do corretor de fundo utilizado (lâmpada de D_2 ou Zeeman), não foi possível a obtenção de melhores resultados na presença do fosfato. Entretanto, quando na forma de HPO_4^{2-} , a mesma redução no sinal do arsênio ocorre quando esta espécie é adicionada em concentração 10x maior (50 mg L^{-1}) em comparação ao estudo supracitado. A menor interferência deste ânion deve-se à sua maior volatilidade e remoção mais eficiente durante a etapa de pirólise. Desta forma, esses estudos evidenciam que a forma química como o interferente está presente na matriz é muito importante para o melhor

entendimento dessas interferências químicas, propondo estratégias analíticas de como superá-las, empregando por exemplo, em GF AAS, o uso de modificadores químicos.

Martinsen e Langmyhr (1982) estudaram a presença do sulfato no GF AAS, e concluíram que, por ser uma espécie termicamente estável, não é completamente removido do tubo de grafite mesmo em temperaturas de pirólise de até 1100 °C, de forma que na etapa de atomização, a correção por fonte contínua não compensa a presença desse interferente.

O problema principal da correção por fonte contínua é que esta se baseia em uma média de todas as emissões de fundo no intervalo de comprimento de onda do monocromador. Assim, a emissão do fundo estimada pela lâmpada de D₂ pode gerar divergências do sinal de fundo na linha de emissão do analito. Já o corretor por efeito Zeeman tem a grande vantagem de corrigir o sinal de fundo no comprimento de onda exato do analito (FERNANDEZ & BEATY, 1984; SAEED & THOMASSEN, 1981; WELZ & SPERLING, 1999).

Devido às características intrínsecas de cada corretor de fundo, já é conhecido na literatura que inevitavelmente melhores razões sinal/ruído são obtidos por correção por efeito Zeeman. Na determinação de As nas matrizes estudadas, interferências provenientes da matriz não foram bem resolvidas pelo corretor por lâmpada de D₂, sendo necessário o uso de modificador químico em quantidades elevadas, o que inevitavelmente influenciou na sensibilidade do método para a determinação de As. Contudo esses estudos serão finalizados, pois, testes de exatidão indicaram que a determinação de As na presença de reduzida quantidade de modificador químico (3 µg Pd) em meio ácido, leva a valores de recuperação em torno de 70%, que, considerando a fração mássica do As nos alimentos analisados (< 1 µg g⁻¹), é considerado satisfatório, conforme disposto pela Comunidade Europeia.

Em relação ao chumbo, a contaminação dos solos por este elemento ocorre principalmente por atividade antrópica, incluindo emissões de gases veiculares e industriais, atividades de mineração, uso de fertilizantes, pesticidas e rejeitos industriais em geral. Embora não seja um elemento essencial para as plantas, é facilmente absorvido e acumulado em diferentes partes delas. O uso de fertilizantes aumenta a concentração das formas lábeis de chumbo no solo, bem como sua absorção pelas raízes e translocação através da planta. As folhas também absorvem o chumbo da atmosfera e o armazenam, sendo considerada uma fonte de contaminação para as sementes, quando ao entrar em contato com as folhas (ALVES *et al.*, 2008; SHARMA & DUBEY, 2005; SILVA, SANTOS & GUILHERME, 2015).

A maioria das plantas desenvolve anomalias e pode ter seu desenvolvimento impedido na presença de chumbo; no entanto, algumas plantas fitorremediadoras, como é o

caso da *Cannabis sativa*, conseguem se desenvolver em ambientes contaminados sem grandes alterações no desenvolvimento. Assim, o consumo de derivados dessas plantas pode representar riscos à saúde (ALVES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; SHARMA & DUBEY, 2005; SILVA, SANTOS & GUILHERME, 2015).

Os resultados obtidos foram comparados com outros estudos que relatam as concentrações de As, Cd e Pb sementes de *C. sativa* (TABELA 27) (KORKMAZ *et al.*, 2010; ANGELOVA *et al.*, 2004; MIHOC *et al.*, 2012; MIHOC *et al.*, 2013; EBOH & THOMAS, 2005; LINGER *et al.*, 2002; MOGHADDAM *et al.*, 2012).

TABELA 27 – Comparação das concentrações de As, Cd e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes da planta *Cannabis* com os valores encontrados no presente estudo.

Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Referência
As	Cd	Pb	
NR	0,01 – 0,02	< LOQ	Korkmaz <i>et al.</i> 2010
NR	0,34 – 1,00	1,00 – 7,60	Angelova <i>et al.</i> 2004
NR	NR	0,22 – 0,63	Mihoc <i>et al.</i> 2013
NR	1,30 – 4,00	NR	Mihoc <i>et al.</i> 2012
7,48	2,40	0,42	Eboh & Thomas 2005
NR	1,03 – 1,19	1,69 – 1,98	Linger <i>et al.</i> 2002
NR	0,56	6,32	Moghaddam <i>et al.</i> 2020
< LOD	0,06 – 0,07	1,07 – 1,38	Neste estudo

NR - não reportado; LOD - Limite de detecção;

Os níveis dos analitos As, Cd e Pb presentes nas amostras estudadas estão de acordo com os valores relatados na literatura. Em relação aos valores de LOQ para Cd, este estudo forneceu o melhor nível de detectabilidade ($\text{LOQ} = 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$) em comparação com os estudos anteriores na literatura ($\text{LOQ} 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ – Mihoc *et al.*, 2012) e ($0,66 \mu\text{g g}^{-1}$ – Angelova *et al.*, 2004), respectivamente. Para Pb, também foi atingido um nível de detectabilidade satisfatório ($\text{LOQ} = 0,42 \mu\text{g g}^{-1}$), levando em consideração que, neste estudo, nenhum modificador químico foi utilizado na determinação deste elemento. Para a quantificação do arsênio não foi possível estabelecer comparações dos valores do LOQ, já que a maior parte dos trabalhos supracitados não reportam a determinação deste analito.

Os resultados do presente trabalho mostraram que os teores de chumbo presente nas amostras de sementes de cânhamo (SC1, SC2 e SD) ultrapassam os limites estabelecidos pelas agências reguladoras, sendo estes resultados concordantes com os estudos de toxicidade de produtos de cânhamo desenvolvidos pelos autores supracitados. Portanto, é necessário monitorar os níveis desses elementos tóxicos nos alimentos de cânhamo.

5. Conclusões

Os elementos quantificados por ICP OES apresentam funções nutricionais importantes nas plantas e seres humanos. Os resultados obtidos evidenciaram que porções de 10-20 g dos alimentos de cânhamo estudados nesse trabalho fornecem grande parte da quantidade de ingestão diária recomendada para adultos, reforçando o elevado potencial nutritivo destes alimentos.

Neste estudo, os níveis de metais nas sementes e derivados de *Cannabis sativa* foram analisados quanto ao teor de As, Cd e Pb por GF AAS. Os métodos propostos mostraram-se simples, rápidos e confiáveis para as determinações desses elementos. A solubilização alcalina mostrou ser uma interessante estratégia alternativa de preparo de amostras para a quantificação de espécies inorgânicas em amostras de sementes de cânhamo, e seus derivados.

Os resultados forneceram bons valores de recuperação, dentro da faixa de 87 – 100%, com valores de RSD < 7% para As, Cd e Pb. Também foi possível o desenvolvimento de métodos para quantificação de Cd e Pb com reduzido uso de modificador químico, enquanto para As em meio de HNO₃, fez-se necessária a presença do Pd(NO₃)₂ em maior quantidade, entretanto, o uso do solvente alcalino TMAH permitiu a redução no uso do modificador. A avaliação das figuras de mérito mostrou que foi possível desenvolver um método eficaz para determinação de elementos inorgânicos mesmo na ausência das condições STPF.

Foi possível desenvolver um único método de preparo de amostras para os três analitos. Os métodos foram rápidos (10 minutos para meio alcalino e 30 para meio ácido), de forma que se alcançou uma boa frequência analítica. Utilizaram-se reagentes diluídos e em volume mínimo (10 mL de TMAH 0,1 % m v⁻¹ e 620 µL de HNO₃ 65 % v v⁻¹), em concordância com os princípios da química verde. Além de que os custos das análises foram reduzidos, uma vez que o equipamento utilizado foi simples e com ausência de algumas condições STPF.

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que as sementes de cânhamo contêm níveis de Pb acima do limite máximo estabelecido pelas agências reguladoras. Em termos de teor de cádmio, as sementes estão abaixo dos limites recomendados pelas agências reguladoras, enquanto para arsênio não foi possível inferir o nível de segurança. Desta forma, torna-se necessário monitorar o teor de contaminantes inorgânicos nas sementes de cânhamo a fim de se promover um consumo seguro para a população.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas visando a conclusão do estudo desenvolvido, pretende-se refinar a determinação de As nas matrizes estudadas. Estudos de exatidão indicaram que a determinação de As na presença de reduzida quantidade de modificador químico ($< 3\mu\text{g Pd}$) em meio alcalino leva a valores de recuperação em torno de 70%. Entretanto, esse valor de recuperação ainda é satisfatório levando-se em consideração a fração mássica do analito na amostra, conforme disposto pela Comunidade Europeia (valores de recuperação de no mínimo 70% são considerados satisfatórios para frações mássicas menores que $1\mu\text{g g}^{-1}$), sendo esse o teor de As nas matrizes alimentícias estudadas nesse trabalho.

Desta forma esse refinamento se faz necessário no intuito de se melhorar a sensibilidade do método e adequá-lo aos limites máximos preconizados pelas agências reguladoras, e os estudos indicam que esse caminho parece ser possível.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. C.; SOUZA, A. P.; PÔRTO, M. L.; ARRUDA, J. A.; JÚNIOR, U. A. T.; SILVA, G. B.; ARAÚJO, R. C.; SANTOS, D. Absorção e distribuição de chumbo em plantas devetiver, jureminha e algaroba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. 32(3), 1329-1336, 2008.
- ALVES, M. C. Teste t de Student. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba. 15p. 2017.
- ANGELOVA, V.; IVANOVA, R. IVANOV, K. Heavy Metal Accumulation and Distribution in Oil Crops. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 35(17-18), 2551-2566, 2005.
- ANGELOVA, V.; IVANOVA, R.; DELIBALTOVA, V.; IVANOV, K. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). **Industrial Crops and Products**. 19, 197–205, 2004.
- ANSCHAU, K. F.; ENDERS, M. S. P.; SENGHER, C. M.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; MULLER, E. I. A novel strategy for medical foods digestion and subsequent elemental determination using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**. 147, 1055-1060, 2019.
- ANVISA - Guia nº 10/2017 Versão 1. Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/%281%29Guia+10+v1+Tratament+o+estatistico+validacao+analitica.pdf/85b0e965-d72f-4b7c-bd2e-17de13af1976>>. Acessado em setembro de 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. – Instrução Normativa - IN Nº 28, de 26 de julho de 2018.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013.
- ARSLAN, Z; TYSON, J. F. Slurry sampling for determination of lead in marine plankton by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. 86, 227–234, 2007.
- BAKIRDERE, S.; YAROGLU, T.; TIRIK, N.; DEMIROZ, M. FIDAN, A. K.; MARUALDALI, O.; KARACA, A. Determination of As, Cd, and Pb in tap water and bottled water samples by using optimized GFAAS system with Pd-Mg and Ni as matrix modifiers. **Journal of Spectroscopy**. 1, 1-7, 2013.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. P.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. 23(4), 629-643, 2010.

BARELA, P. S.; SILVA, N.A.; PEREIRA, J.S.F.; MARQUES, J.C.; RODRIGUES, L.F.; MORAES, D.P. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. **Fuel**. 204, 85–90, 2017.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRAO, J. J.; GUARDIA, M. Especificação de Arsênio - uma revisão. **Química Nova [online]**. 23(1), 58-70, 2000.

BASHIR, S.; WAHAB, A.; QAYUM, M.; KHAN, M. I.; KHAN, M.; A. Determination and the effect of processing on the presence of toxic metals in edible oils and ghee consumed in Kohat, Khyber Pakhyunkhwa. **International Journal of Recent Scientific Research**. 8(10), 20456-20461, 2017.

BETTINELLI, M.; BARONI, U.; PASTORELLI, N. Determination of Arsenic, Cadmium, Lead, Antimony, Selenium and Thallium in Coal Fly Ash Using the Stabilised Temperature Platform Furnace and Zeeman-effect Background Correction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 3, 1005-1011, 1988.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLATO, R. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**. 2, 734-738, 2010.

BOLAÑOS, D.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M. Elemental Analysis of Amaranth, Chia, Sesame, Linen, and Quinoa Seeds by ICP-OES: Assessment of Classification by Chemometrics. **Food Analytical Methods**. 9, 477–484, 2016.

BORGES, A. R.; BECKER, E.M.; DESSUY, M.B.; VALE, M.G.R.; WELZ, B. Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**. 92, 1–8, 2014.

BORGES, D. L. G.; DIAS, L. F.; VEIGA, M. A. M. S.; CURTIUS, A. J. Determination of cadmium in sediments and in sewage sludge by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry using iridium as permanent modifier. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 14(2), 291-296, 2003.

BRADSHAW, D; SLAVIN, W. Rapid slurry analysis of solid coal and fly ash samples. **Spectrochimica Acta Part B**. 44, 1245, 1989.

CALLAWAY, J. C. Hempseed oil in a nutshell. **Personal Care**. 21(3), 130-133, 2010.

CAL-PIETRO, M. J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J. M.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**. 56, 1–51, 2002.

CAMPOREZ, P. Anvisa libera venda de remédio à base de maconha em farmácias no Brasil, mas veta cultivo. Estadão – Jornal digital. Disponível em: <<https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,anvisa-libera-registro-e-comercializacao-de-remedio-a-base-de-maconha-em-farmacias-no-brasil,70003111886>>. Acessado em abril de 2020.

CAMPOS, N. S.; OLIVEIRA, M. A. L. IZUMI, C. M. S. SOUSA, R. A. Alkaline solubilization of chicken tissues monitored by raman spectroscopy followed by Pb determination by GF AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 29, 353, 2018.

CARLINI, E. A. A História da Maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 55(4), 314-317, 2006.

CARVALHO, A. R. C. Mecanismos de resposta a mercúrio em plantas de sapal. 2009. Dissertação (Mestrado em Métodos Biomoleculares Avançados). Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro, Portugal.

CASTILHOS, D.; GUADAGNIN, C. Acúmulo de cromo e seus efeitos na fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes em soja. **Current Agricultural Science and Technology**. 7(2), 121–124, 2012.

CASTRO, M. A.; ALLER, A. J. Mechanistic study of the aluminum interference in the determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 58, 901–918, 2003.

CHAVES, E. S.; SANOS, E. J.; ARAUJO, R. G. O.; OLIVEIRA, J. V.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**. 96, 71–76, 2010.

CHAKRABORTI, D.; IRGOLIC, K. J.; ADAMS, F. Matrix Interferences in Arsenic Determinations by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: Recommendations for the Determination of Arsenic in Water Samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. 17, 241-256, 1984.

CHEN, X.; MARSHALL, W. Enzymatic digestion-high-pressure homogenization prior to slurry introduction graphite furnace atomic absorption spectrometry for selenium determination in plant and animal tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47, 3727–3732, 1999.

CHRISTIAN, G. D. Analytical Chemistry - Ed. John Wiley & Sons. 1986 - New York – USA.

CINDRIC, I. J.; ZEINER, M.; KRPETIC, M.; STINGEDER, G. ICP-AES determination of minor and major elements in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) after microwave assisted digestion. **Microchemical Journal**. 105, 72–76, 2012.

CITTI, C.; LINCiano, P.; FORNI, F.; VANDELLI, M. A.; GIGLI, G.; LAGANÀ, A.; CANNAZZA, G. Analysis of impurities of cannabidiol from hemp. Isolation, characterization and synthesis of cannabidibutol, the novel cannabidiol butyl analog. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 175, 112752, 2019.

CITTI, C. PACCHETTI, B.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F.; CANNAZZA, G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 149, 532–540, 2018.

CÓRDOBA, M. H.; GARCÍA, I. L. A fast method for the determination of lead in paprika by electrothermal atomic-absorption spectrometry with slurry sample introduction. **Talanta**. 38, 1247–1251, 1991.

CRIMALDI, M.; FAUGNO, S.; SANNINO, M.; ARDITO, L. Optimization of hemp seeds (*Canapa sativa* L.) oil mechanical extraction, **Chemical Engineering Transactions**. 58, 373-378, 2017.

DEFERNE, J. L.; PATE, D. W. Hemp seed oil: A source of valuable fatty acids. **Journal of the International Hemp Association**. 3(1), 4-7, 1996.

DITRÓI, K.; KLEINER, D.; BOSZORMENYI, A.; SZENTMIHÁLYI, K.; FÉBEL, H. The Alimentary Impact of Hemp Seed. **Acta Alimentaria**. 42(3), 410–416, 2013.

EBOH, L. O.; THOMAS, E. B. Analysis of heavy metal content in cannabis leaf and seed cultivated in southern part of Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**. 4, 349–351, 2005.

EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Arsenic in Food. **EFSA Journal**. 7(10), 1351-1550, 2009.

EFSA - European Food Safety Authority; Cadmium dietary exposure in the European population. **EFSA Journal**. 10(1), 2551-2588, 2012a.

EFSA - European Food Safety Authority; Lead dietary exposure in the European population. **EFSA Journal**. 10(7), 2831-2890, 2012b.

ELSON, C. M.; HYNES, D. L.; MACNEIL, P. A. Trace Metal Content of Rapeseed Meals, Oils and Seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 56, 998-999, 1979.

EPA – Environmental Protection Agency (United States). Method 7010: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. Revisão 0, 24p, 2007. Disponível em <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/7010.pdf>>. Acessado em janeiro de 2020.

EPA Form 3030 06.03. DECISION of the Technical Board of Appeal 3.3.10 of 2 March 2010. Summary of Facts and Submissions. Disponível em <<https://www.epo.org/law-practice/case-law-appeals/pdf/t080879eu1.pdf>>. Acessado em janeiro de 2019.

ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Plant Nutrition 3: Micronutrients and Metals. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Plant-Nutrition-III-Micronutrients.pdf>. Acessado em janeiro de 2019.

FAO/WHO (1972). Expert Committee on Food Additives, World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1972). Evaluation of certain food additives and the contaminants mercury, lead, and cadmium: sixteenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 4-12 April 1972.

FATHORDOOBADY, F.; SINGH, A.; KITTS, D. D.; SINGH, A. P. Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. **Food Reviews International**. 35(7), 664-684, 2019.

FDA. Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration. Revision of the Nutrition and Supplement Facts Labels. Published in the Federal Register on 05/27/2016.

FELIPE-SOTELO, M. CARLOSENA, A.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; MUNIATEGUI, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA, D. Evaluation of two atomisation modes for direct determination of molybdenum in complex matrices by ultrasonic slurry sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 524, 329–337, 2004.

FERNANDES, K. G. MORAES, M.; NETO, J. A. G.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**. 26(2), 249-252, 2003.

FERNANDES, L. H.; MAINIER, F. B.; Os riscos da exposição ocupacional ao cádmio. **Sistemas & Gestão**. 9, 194-199, 2014.

FERNANDEZ, F. J.; BEATY, M. M. Elimination of spectral interferences in the determination of Se in nickel-base alloys using Zeeman background correction. **Spectrochimica Acta**. 398(2,3), 519-523. 1984.

FISCHER, A.; BRODZIAK-DOPIERALA, B.; LOSKA, K.; STOJKO, J. The Assessment of Toxic Metals in Plants Used in Cosmetics and Cosmetology. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 14(10), 1280, 2017.

FLORES, E. M. M.; PANIZ, J. N. G.; SAIDELLES, A. P. F.; BARIN, J. S.; DRESSLER, V. L.; MULLER, E. I.; COSTA, A. B. Direct Solid Sampling by Flame Atomic Absorption Spectrometry: Determination of Manganese in Coal Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 15(2), 199-204, 2004.

FRANCO, G. R. R.; VIEGAS Jr., C. A Contribuição de Estudos do Canabidiol e Análogos Sintéticos no Desenho de Novos Candidatos a Fármacos contra Transtornos Neuropsiquiátricos e Doenças Neurodegenerativas. **Revista Virtual de Química**. 9(4), 1773-1798, 2017.

G1 – Campinas e Região. Com aval para cultivar cannabis, empresa de SP planeja iniciar produção em dois meses e vender para indústrias têxtil e alimentícia. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/2019/12/09/com-aval-para-cultivar-cannabis-empresa-de-sp-planeja-iniciar-producao-em-dois-meses-e-vender-para-industrias-textil-e-alimenticia.ghtml>>. Acessado em abril de 2020.

GALIĆ, M.; PERČIN, A.; ZGORELEC, Z.; KISIĆ, I. Evaluation of heavy metals accumulation potential of hemp (*Cannabis sativa* L.). **Journal of Central European Agriculture**. 20(2), 700-711, 2019.

GHISI, M.; CHAVES, E. S.; QUADROS, D. P. C.; MARQUES, E. P.; CURTIUS, A. J.; MARQUES, A. L. B. Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**. 98, 62, 2011.

GIACOMELLI, M. B. O.; SILVA, J. B. B.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J. Use of iridium plus rhodium as permanent modifier to determine As, Cd and Pb in acids and ethanol by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. 77, 151–156, 2004.

GIBELLI, J. CBD e THC no tratamento para HIV/AIDS. HempMeds Brasil. Disponível em <<https://hempmeds.com.br/cbd-thc-no-tratamento-de-hiv-aids/>>. Acessado em fevereiro de 2018.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**. 79, 396–401, 2009.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, S. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**. 445, 269–275, 2001.

GRINDLAY, G.; GRAS, L.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGHT, M. T. C. Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. 63(2), 234–243, 2008.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGHT, M. T. C.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. 86, 42–49, 2013.

GUIMARÃES-SILVA, A. K.; LENA, J. C.; FROES, R. E. S.; COSTA, L. M.; NASCENTES, C. C. Evaluation of signal-to-background and Mg II/Mg I ratios as response for the optimization of rare earth elements determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 23(4), 753–762, 2012.

GUMUSKAYA, E.; USTA, M.; BALABAN, M. Carbohydrate components and crystalline structure of organosolv hemp (*Cannabis sativa* L.) bast fibers pulp. **Bioresource Technology**. 98(3), 491–497, 2007.

HARTWIG, C. A.; PEREIRA, R. M.; NOVO, D. L. R.; OLIVEIRA, D. T. T.; MESKO, M. F. Green and efficient sample preparation method for the determination of catalyst residues in margarine by ICP-MS. **Talanta**. 174, 394–400, 2017.

HEMPMEDS BRASIL. Como fazer Manteiga de CBD. Disponível em <<https://hempmeds.com.br/como-fazer-manteiga-de-cbd/>>. Acessado em janeiro de 2019.

HEMPMEDS BRASIL. Disponível em <<https://hempmeds.com.br/qual-a-diferenca-entre-o-canhamo-e-a-maconha/>>. Acessado em março de 2018a.

HEMPMEDS BRASIL. Pesquisa em universidade americana reabre as portas para cultivo de cânhamo no país. Disponível em <<https://hempmeds.com.br/pesquisa-em-universidade-americana-reabre-as-portas-para-cultivo-de-canhamo-no-pais/>>. Acessado em março de 2018b.

INMETRO - Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão 07 de Julho de 2018. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=c_alibensaios>. Acessado em janeiro de 2019.

JERSE, A.; JÁCIMOVIC, R.; MARSIC, N. K.; GERM, M.; SIRCELJ, H.; STIBILJ, V. Determination of iodine in plants by ICP-MS after alkaline microwave extraction. **Microchemical Journal**. 137, 355–362, 2018.

JOHNSON, R. Hemp as an Agricultural Commodity. **Congressional Research Service**. 2017. - 7-5700 - www.crs.gov - RL32725.

Jornal Oficial da União Europeia. REGULAMENTO (CE) N.º 1881/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=PT>>. Acessado em setembro de 2019.

JURANOVIC, I.; BREINHOELDER, P.; STEFFAN, I. Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 18, 54–58, 2003.

KATAOKA, H.; TANAKA, S.; KONISHI, C.; OKAMOTO, Y.; FUJIWARA, T.; ITO, K. Sensitive determination of bromine and iodine in aqueous and biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry using tetramethylammonium hydroxide as a chemical modifier. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. 22, 1792–1798, 2008.

KINGSTON, H. M.; HASWELL S. J. Microwave-Enhanced Chemistry – Fundamentals, Sample Preparation and Applications. ACS Professional Reference Book, Washington, 1997. 772p.

KOJOMA, M.; SEKI, H.; YOSHIDA, S.; MURANAKA, T. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. **Forensic Science International**. 159(2-3), 132-140, 2006.

KORKMAZ, K.; KARA, S. M.; OZKUTLU, F.; GUL, V. Monitoring of heavy metals and selected micronutrients in hempseeds from North-western Turkey. **African Journal of Agricultural Research**. 5(6), 463-467, 2010.

KOWALSKA, M.; ZIOMEK, M.; ZBIKOWSKA, A. Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. **International Journal of Cosmetic Science**. 37, 408–416, 2015.

KRIESE, U.; SCHUMANN, E.; WEBER, W. E.; BEYER, M.; BRUHL, L.; MATTHAUS, B. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. **Euphytica**. 137(3), 339-351, 2004.

KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar; 1ª ed., 2010.

KRUG, F.J; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica, Parte 2: Atomização eletrotérmica em forno de grafite. 2007.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016. 572 p.

LINGER, P.; MUSSIG, J.; FISCHER, H.; KOBERT, J. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. **Industrial Crops and Products**. 16, 33–42, 2002.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CÓRDOVA, M. L. F.; ORTEGA-BARRALES, P.; RUIZ-MEDINA, A. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. **Microchemical Journal**. 110, 444–451, 2013.

LOBO, F. A. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de Cd, Cu, Ni e Pb em biodiesel por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Tese de Doutorado. UNESP, Araraquara, 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; BRICEÑO, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Non-chromatographic screening procedure for arsenic speciation analysis in fish-based baby foods by using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 11–17, 2011.

LOSER, C.; ZEHNSDORF, A.; FUSSY, M.; STARK, H. Conditioning of Heavy Metal-Polluted River Sediment by Cannabis sativa L. **International Journal of Phytoremediation**. 4(1), 27–45, 2002.

LUENGO, R. F. A.; PARMAGNANI, R. M.; PARENTE, M. R.; LIMA, M. F. B. F. Tabela de Composição Nutricional das Hortaliças. Brasília, Embrapa, 2011. Disponível em <<https://www.embrapa.br/documents/1355126/9124396/Tabela%2BNutricional%2Bde%2BHortali%25C3%25A7as/d4ae0965-9e94-4f19-a20e-b7721bdc1266>>. Acessado em setembro de 2019.

L'VOV, B. V. A personal view of the evolution of graphite furnace atomic. **Analytical Chemistry**. 63(19), 924-931, 1991.

MACFARLANE G. R.; BURCHETT, M. D. Cellular distribution of copper, lead, and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.). **Aquatic Botany**. 68, 45-59, 2000.

MARQUES, T. L.; WILTSCHE, H.; MOTTER, H.; NÓBREGA, J. A.; KNAPP, G. High pressure microwave-assisted flow digestion system using a large volume reactor-feasibility for further analysis by inductively coupled plasmabased techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 30, 1898-1905, 2015.

MARQUES, T. L.; WILTSCHE, H.; NÓBREGA, J. A.; WINKLER, M.; KNAPP, G. Performance evaluation of a high-pressure microwave-assisted flow digestion system for juice and milk sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 409, 4449–4458, 2017.

MARTINSEN, I.; LANGMYHR, F. J. Some observations on sulfuric acid reactions in electrothermal atomic absorption spectroscopy with graphite furnaces. **Analytica Chimica Acta**. 135(1), 137-143, 1982.

MARTINSEN, I.; RADZIUK, B.; THOMASSEN, Y. Characterisation of Spectral Interferences in Background Correction for Arsenic, Selenium and Antimony in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 3, 1013-1022, 1988.

MAY, T. W.; BRUMBAUGH, W. G. Matrix Modifier and Lvov Platform for Elimination of Matrix Interferences in the Analysis of Fish Tissues for Lead by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Chemistry**. 54, 1032-1037, 1982.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects. **Journal of Clinical Pharmacology**, 42, 11-19, 2002.

MERLINO, L. C. S. Disponibilidade de bário para plantas de sorgo cultivadas em solo contaminado com o elemento. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2013.

MIGUEL, P. S. B.; GOMES, F. T.; ROCHA, W. S. D.; MARTINS, C. E.; CARVALHO, C. A.; OLIVEIRA, A. V. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**. 24, 12-30, 2010.

MIHOC, M.; POP, G.; ALEXA, E.; RADULOV, I. Microelements Distribution in Whole Hempseeds. **Revista De Chimie**. 64(7), 776-780, 2013.

MIHOC, M.; POP, G.; ALEXA, E.; RADULOV, I. Nutritive quality of romanian hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. **Chemistry Central Journal**. 6, 122, 2012.

MINAMISAWA, H.; OKUNUGI, R.; MINAMISAWA, M.; TANAKA, S.; SAITOH, K.; ARAI, N.; SHIBUKAWA, M. Preconcentration and Determination of Cadmium by GFAAS after Solid-Phase Extraction with Synthetic Zeolite. **Analytical Sciences**. 22, 709-713, 2006.

Ministério das Relações Exteriores – Comissão Nacional de Fiscalização de Entorpecentes. Canabis brasileira (pequenas anotações) – Publicação no 1. Rio de Janeiro: Eds. Batista de Souza & Cia., 1959.

MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L.; SHARIFI, Z. Macro- and microelement content and health risk assessment of heavy metals in various herbs of Iran. **Environmental Science and Pollution Research**. 27, 12320-12331, 2020.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Pública**. 15(2), 119-29, 2004.

NI, Z.; CHEN, Z.; YU, Q.; SUN, X.; TANG, F. Microwave-assisted digestion for trace elements analysis of tree nut oil: evaluation of residual carbon content. **Spectroscopy Letters**. 51(10), 518-523, 2018.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta, Part B**. 61, 465–495, 2006.

NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização. **Química Nova**. 31(1), 104-113, 2008.

NUNES, J. L. S. Nutrientes. Agrolink. Disponível em <https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_361443.html>. Acessado em janeiro de 2019.

OLIVEIRA, A.; BACCAN, N.; CADORE, S. Evaluation of Metal Ions in Rice Samples: Extraction and Direct Determination by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 23(5), 838-845, 2012.

OLIVEIRA, J. S. S.; KRZYZANIAK, S. R.; PICOLOTO, R. S.; BOLZAN, R. C.; MELLO, P. A. Determination of Inorganic Contaminants in Electrical and Electronic Equipment after Digestion Using Microwave-Assisted Single Reaction Chamber. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 28(9), 1657-1664, 2017.

OLIVEIRA, R. F.; WINDMOLLER, C. C.; NETO, W. B.; SOUZA, C. C.; BEINNER, M. A.; SILVA, J. B. B. Determination of cadmium and lead in cassava employing slurry sampling and graphite furnace atomic absorption spectrometry after multivariate optimization. **Analytical Methods**. 5, 5746-5752, 2013.

OLIVEIRA, R. M.; ANTUNES, A. C. N.; VIEIRA, M. A.; MEDINA, A. L.; RIBEIRO, A. S. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**. 124, 402–409, 2016.

OOMAH, B. D.; BUSSON, M.; GODFREY, D. V.; DROVER, J. C. G. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. **Food Chemistry**. 76, 33–43, 2002.

ORESTE, E. Q.; DE OLIVEIRA, R.M.; NUNES, A.M.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. **Analytical Methods**. 5(6), 1590, 2013.

PEART, J. Industrial Hemp in the United States. USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/41740/15867_ages001e_1_.pdf?v=42087>. Acessado em março de 2018.

PERAMAKI, P.; PESONEN, M.; PIISPANEN, J. Development of a microwave sample preparation method for the determination of arsenic in humus and moss samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analusis**. 28, 830-834, 2000.

PERKIN ELMER - Integrated Platform HGA Graphite Tubes. Disponível em <<https://www.perkinelmer.com/product/graphite-tubes-integrated-platform-pk100-n3110149>>. Acessado em setembro de 2019.

PICHLER, U.; HAASE, A.; KNAPP, G. Microwave-Enhanced Flow System for High-Temperature Digestion of Resistant Organic Materials. **Analytical Chemistry**. 71, 4050-4055, 1999.

PRZEMYSŁAW, N.; MARCIN, S.; JERZY, S. Comparison of modifiers for determination of arsenic, antimony and selenium by atomic absorption spectrometry with atomization in graphite tube or hydride generation and in-situ preconcentration in graphite tube. **Microchemical Journal**. 137-145, 2002.

RANGEL, O. J. P.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W.; DYNIA, J. F. Efeitos de aplicações de lodos de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 30, 583-594, 2006.

RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; POZEBON, D. Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**. 64(1), 105–110, 2000.

RIBEIRO, R. V.; VIEIRA, J. C.; LOBO, F. A.; FROES-SILVA, R. E. S. Comparison between Ultrasound Assisted Extraction and Microwave Digestion in the Determination of Arsenic in Edible Grains. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 00(00), 1-8, 2017.

ROBLES, L. C.; ALLER, A. J. Determination of cadmium in biological and environmental samples by slurry electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. 42, 1731–1744, 1995.

RODRIGUES, L. F.; MATTOS, J. C. P.; DRESSLER, V. L.; POZEBON, D.; FLORES, E. M. M. Determination of cadmium, copper and lead in alumina based catalysts by direct solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. 62, 933–938, 2007.

RODUSHKIN, I.; RUTH, T.; HUHTASAARI, A. Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. **Analytica Chimica Acta**. 378, 191-200, 1999.

RUSTICHELLI, C.; FERIOLI, V.; BARALDI, M.; ZANOLI, P.; GAMBERINI, G. Analysis of cannabinoids in fiber hemp plant varieties (*Cannabis Sativa* L.) by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**. 48(3-4), 215-222, 1998.

SAEED, K.; THOMASSEN, Y. Spectral interferences from phosphate matrices in the determination of arsenic, antimony, selenium and tellurium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 130(2), 281-287, 1981.

SAVIO, M.; ORTIZ, M. S.; ALMEIDA, C. A.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D.; GIL, R. A. Multielemental analysis in vegetable edible oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide. **Food Chemistry**. 159, 433–438, 2014.

SCHLEMMER, G.; RADZIUK, B.; Analytical graphite furnace atomic absorption spectrometry: a laboratory guide. 1 ed, Birkhäuser Verlag Basell, Switzerland, 1999.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 17(1), 35-52, 2005.

SIANO, F.; MOCCIA, S.; PICARIELLO, G.; RUSSO, G. L.; SORRNTINO, G.; DI STASIO, M. LA CARA, F.; VOLPE, M. G. Comparative Study of Chemical, Biochemical Characteristic and ATR-FTIR Analysis of Seeds, Oil and Flour of the Edible Fedora Cultivar Hemp (*Cannabis sativa* L.). **Molecules**. 24, 83, 2019.

SILVA, E.; SANTOS, P. S.; GUILHERME, M. F. S. Chumbo nas plantas: uma breve revisão sobre seus efeitos, mecanismos toxicológicos e remediação. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**. 2(3), 1-21, 2015.

SILVA, J. S. A.; CHAVES, E. D.; SANTOS, E. J.; SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb and Tl in biodiesel as microemulsion by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 21(4), 620-626, 2010.

SILVA, M. A. O. Novas Tecnologias e Fundamentos Práticos Relacionados com a Técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado. Disponível em:
<<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/minicurso%20marcelo%20silva%20-%20perkinelmer.pdf>>. Acessado em maio de 2018.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42(4), 527-535, 2007.

SILVA, M. M.; VALE, M. G. R.; DAMIN, I. S. F.; WELZ, B.; MANDAJI, M.; FETT, J. P. Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (*Oryza sativa* L.) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 377, 165–172, 2003.

SILVA, R. G. L.; SANTELLI, R. E.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E.; SELLA, S. M. Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**. 124, 1843, 1999.

SILVEIRA, V. C.; FADANELLI, C.; SPEROTTO, R. A.; STEIN, R. J.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; VAZ JUNIOR, I. S.; DIAS, J. F.; FETT, J. P. Role of ferritin in the rice tolerance to iron overload. **Scientia Agricola**. 66, 549-555, 2009.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica, 1 ed., Thomson, São Paulo, 2006.

SLAVIN, W.; MANNING, D. C. The L'vov platform for furnace atomic absorption analysis. **Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy**. 35, 701–714, 1980.

SMALL, E. Cannabis: A Complete Guide. Ottawa, Canada: CRC Press, 2016. 567p.

SOARES, C. B. F. S.; ACCIOLY, A. M. G.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Acumulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caules e folhas

de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13(3), 302-315, 2001.

SOUSA, R. A.; SABARENSE, C. M.; PRADO, G. I. P.; METZE, K.; CADORE, S. Lead biomonitoring in different organs of lead intoxicated rats employing GF AAS and different sample preparations. **Talanta**. 104, 90-96, 2013.

SPOON SUPER ALIMENTOS. Disponível em <<https://www.spoonsuperalimentos.com.br/catalogsearch/result/?q=c%C3%A2nhamo>>. Acessado em janeiro de 2019.

SUVAR, S. N.; BLEIZIFFER, R.; PODEA, P.; IORDACHE, A.; VOICA, C.; ZGAVAROGEA, R.; CULEA, M. A comparative mass spectrometric study of fatty acids and metals in some seed extracts. **European Journal of Mass Spectrometry**. 22, 253–260, 2016.

SZENTMIHALYI, K.; VINKLER, P.; LAKATOS, B.; ILLÉS, V.; THEN, M. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. **Bioresource Technology**. 82(2), 195-201, 2002.

SZYCZEWSKI, P.; FRANKOWSKI, M.; ZIOLA-FRANKOWSKA, A.; SIEPAK, J.; SZYCZEWSKI, T.; PIOTROWSKI, P. A comparative study of the content of heavy metals in oils: linseed oil, rapeseed oil and soybean oil in technological production processes. **Archives of Environmental Protection**. 42(3), 37-40, 2016.

THE EUROPEAN COMMUNITIES. implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, COMMISSION DECISION of 12 August 2002. Disponível em <<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>>. Acessado em setembro de 2019.

THEIL, E. C.; MATZAPETAKIS, M.; LIU, X. Ferritins: iron/oxygen biominerals in protein nanocages. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. 11(7), 803-810, 2006.

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of detection in spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**. 18(12), 112–114, 2003.

TIAN, S.; DU, W.; LIU, F.; BAI, X. Determination of the trace element contents of *Althaea rosea* seeds by Atomic Absorption Spectrometry and evaluation using multivariate analysis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 6(9), 10-15, 2014.

TIWARI, S. S.; TRIPATHI, A.; SINGH, A. S.; RAWAT, B. K. S. Phytochemical standardization, heavy metals estimation and antioxidant evaluation on *Cannabis sativa* Linn. **Pharmanest International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**. 5, 1783–1790, 2014.

UCHIDA, T.; ISOYAMA, H.; YAMADA, K.; OGUCHI, K.; NAKAGAWA, G.; SUGIE H.; IIDA, C. Determination of twelve elements in botanical samples with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after leaching with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid. **Analytica Chimica Acta**. 256, 277–284, 1992.

ULUATA, S.; OZDEMIR, N. Antioxidant activities and oxidative stabilities of some unconventional oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 9, 551-559, 2012.

VAN BEIK, J.; KOSERA, V.S.; DE MARANHÃO, T.A.; CHAVES, E.S. Alkaline solubilization and ultrasound assisted extraction for Cr and Pb determination in leather by atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**. 9(22), 3284–3289, 2017.

VASILEIOS, K.; NIKOLAOS, R.; IOANNIS, P.; NIKOLAOS, T.; EFROSINI, P. Evaluation of Different Modifiers for the Determination of Arsenic in Leachate Samples from Sanitary Landfills by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Letters**. 45, 592-602, 2012.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry: what can we expect?. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 14(2), 220-229, 2003.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R. Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Part 2.* Determination of Arsenic, Cadmium, Copper, Manganese, Lead, Antimony, Selenium and Thallium in Water. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 3, 695-701, 1988.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R. Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Part 5.* Performance for the Determination of 21 Elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 7(3), 1257–1271, 1992.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3 ed., Wiley-VCH: Weinheim, New York, 1999.

WILTSCHE, H.; TIRL, P.; MOTTER, H.; WINKLER, M.; KNAPP, G. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 29, 272-279, 2014.

ZEHRA, S. S.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, T.; WAHEED, A. Assessment of heavy metal accumulation and their translocation in plant species. **African Journal of Biotechnology**. 8, 2802–2810, 2009.

ZERIHUN, A.; CHANDRAVANSI, B. S.; DEBEBE, A.; MEHARI, B. Levels of selected metals in leaves of Cannabis sativa L. cultivated in Ethiopia. **Springer Plus**. 4, 359-369, 2015.

ZHOU, C. Y.; WANG, M. K.; KOH, L. L.; WEEB, Y. C. Microwave digestion of biological samples with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid for element determination. **Talanta**. 43, 1061-1068, 1996.

ZOLLER, O.; RHYN, P.; ZIMMERLI, B. High-performance liquid chromatographic determination of Δ^9 - tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Journal of Chromatography A**. 872(1-2), 101-110, 2000.

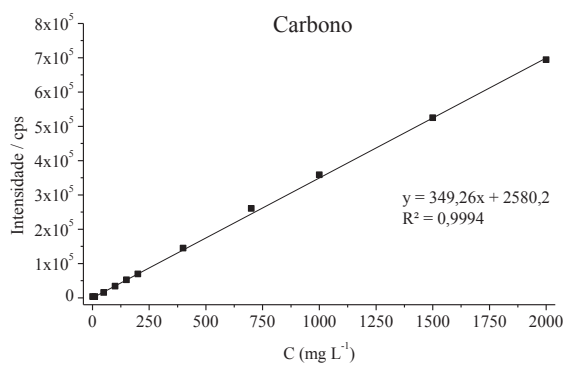
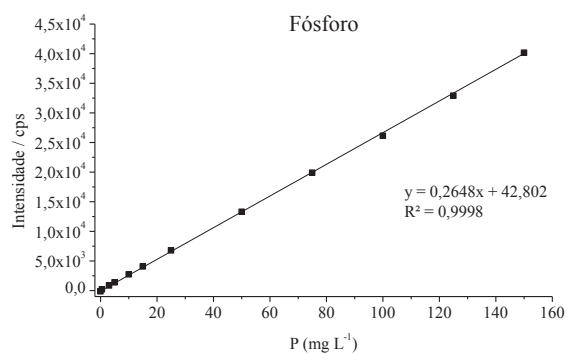
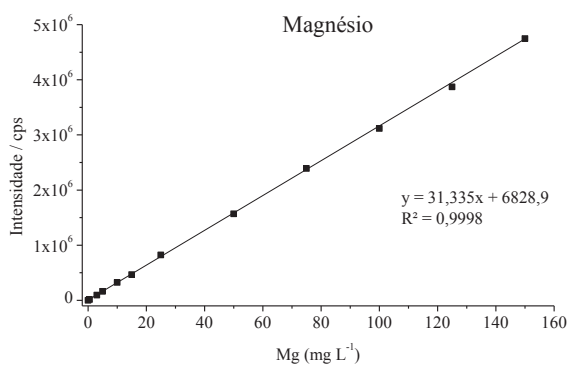
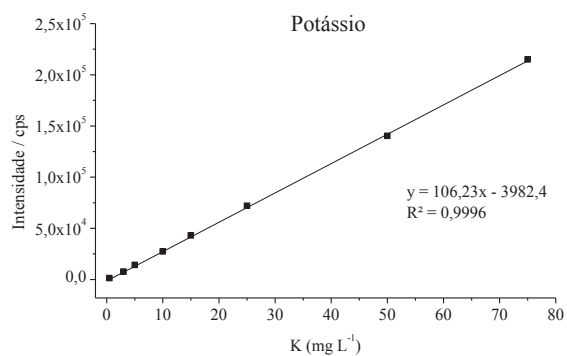
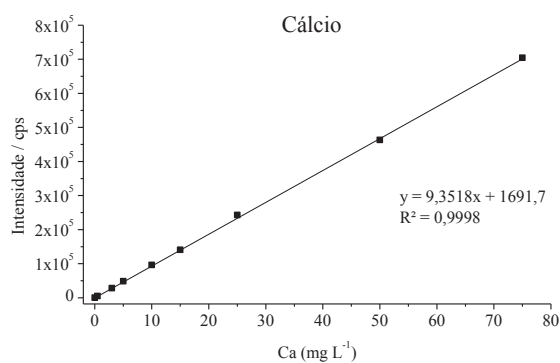
ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 30(3), 271-280, 2008.

ZUARDI, A. W. History of *cannabis* as a medicine. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 28(2), 153-7, 2006.

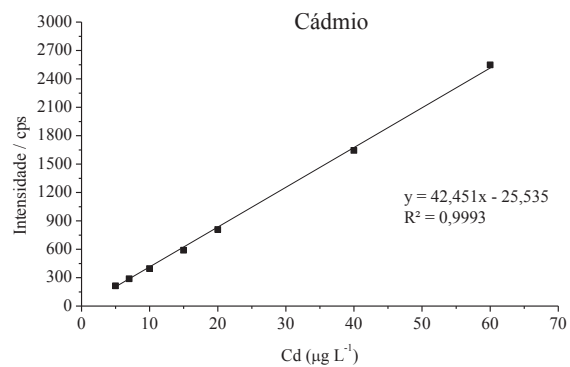
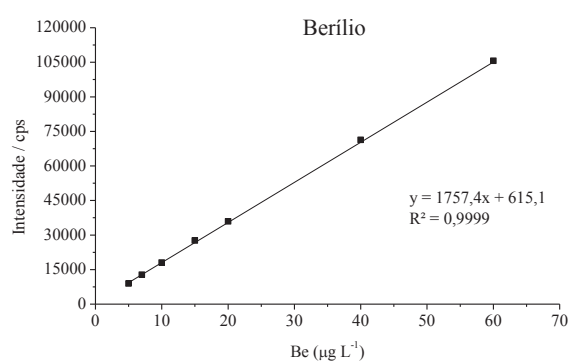
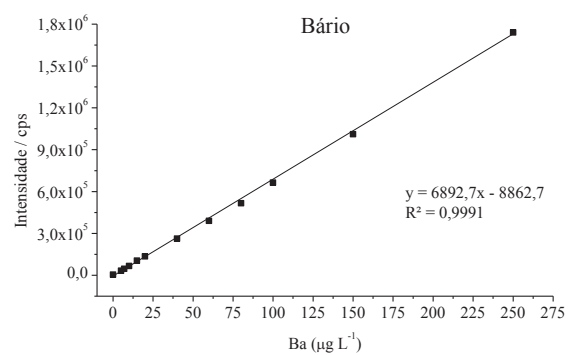
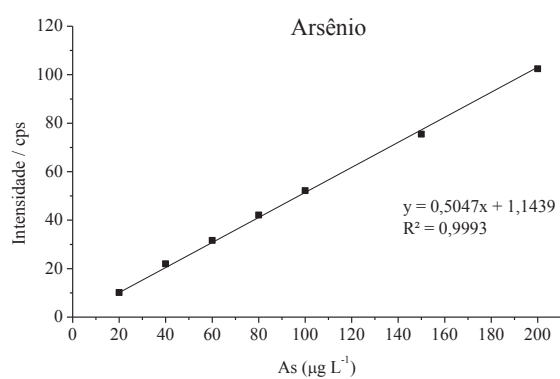
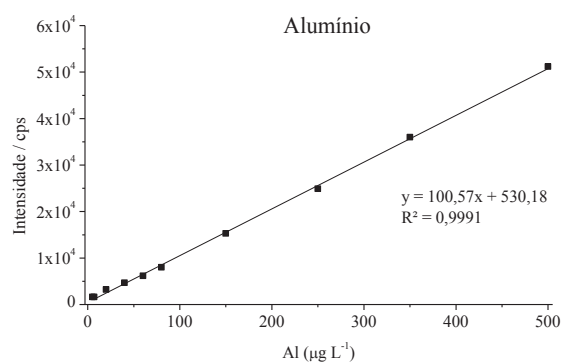
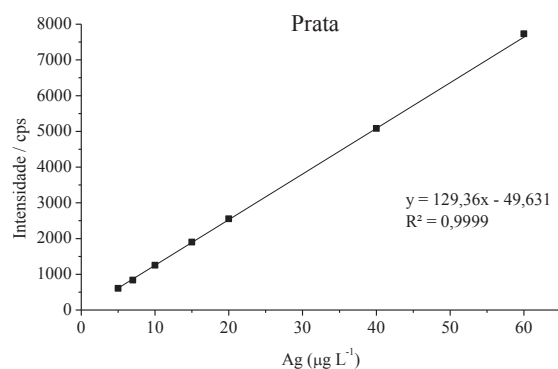
ANEXO 1

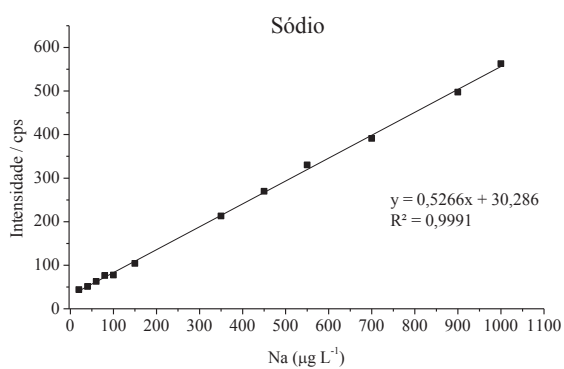
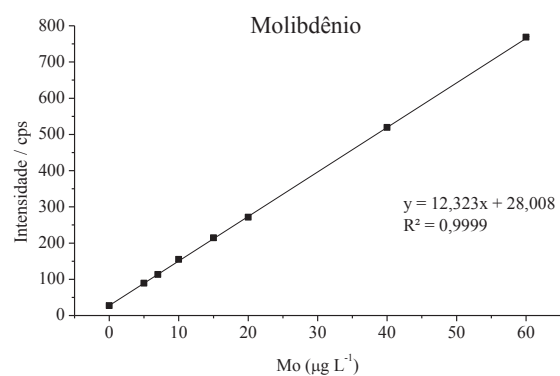
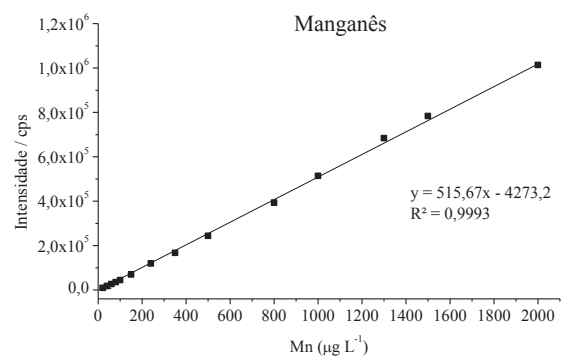
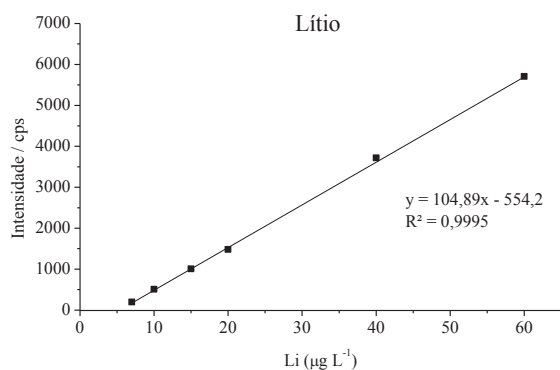
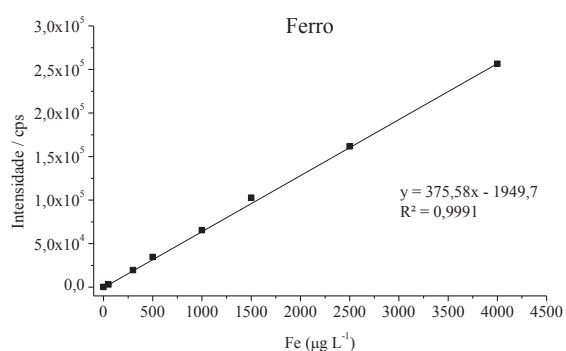
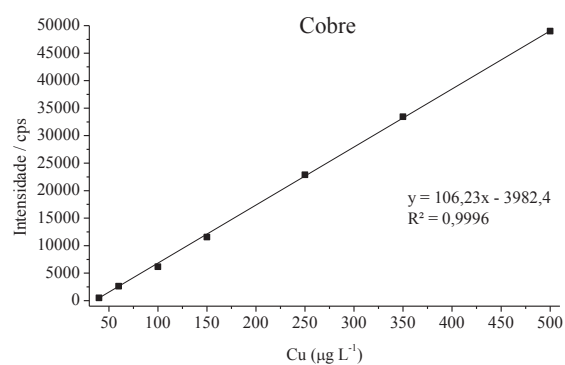
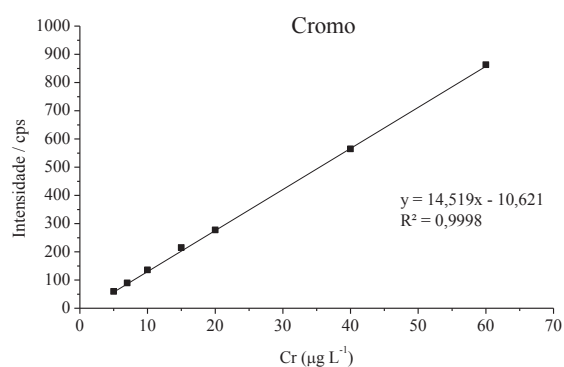
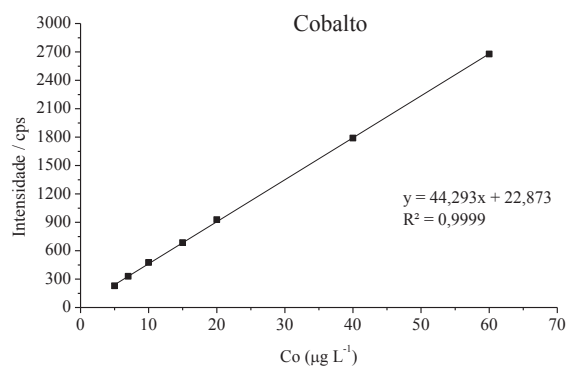
Curvas Analíticas de Calibração obtidas para os elementos químicos quantificados por ICP OES.

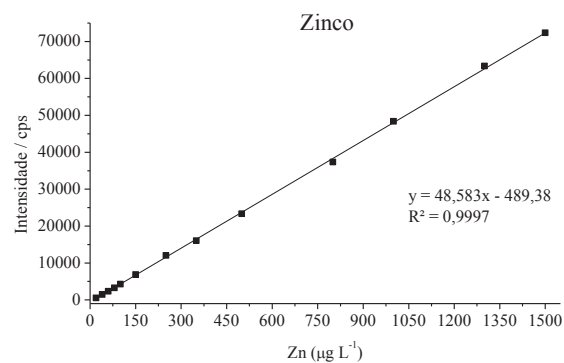
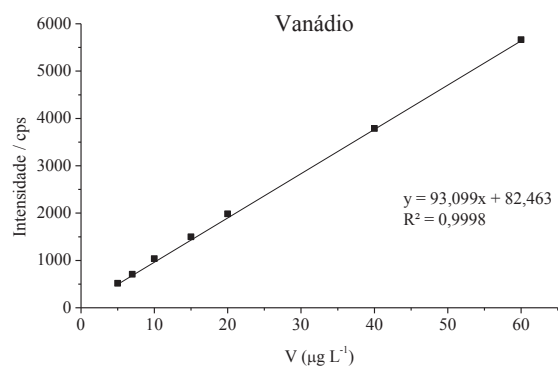
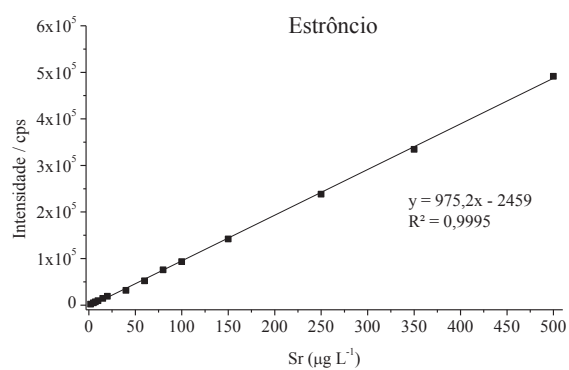
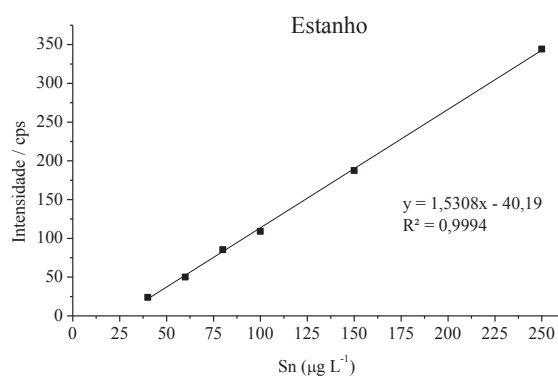
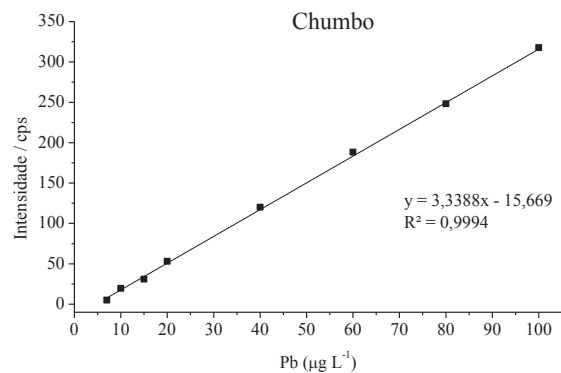
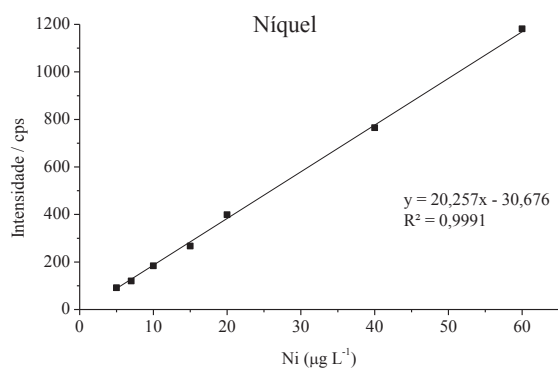
Macroelementos: Ca, K, Mg, P e C.



Microelementos: Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sn, Sr, V e Zn.







ANEXO 2

Curvas analíticas de calibração desenvolvidas no GF AAS para os analitos As, Cd e Pb.

FIGURA A1 – Curvas analíticas de calibração para As em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹ e em meio de 0,1% m v⁻¹ TMAH. Faixa de calibração: 0,6 – 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; modificador químico: 3 μg e 7 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Volume de solução padrão: 20 μL ; volume de modificador químico: 5 μL .

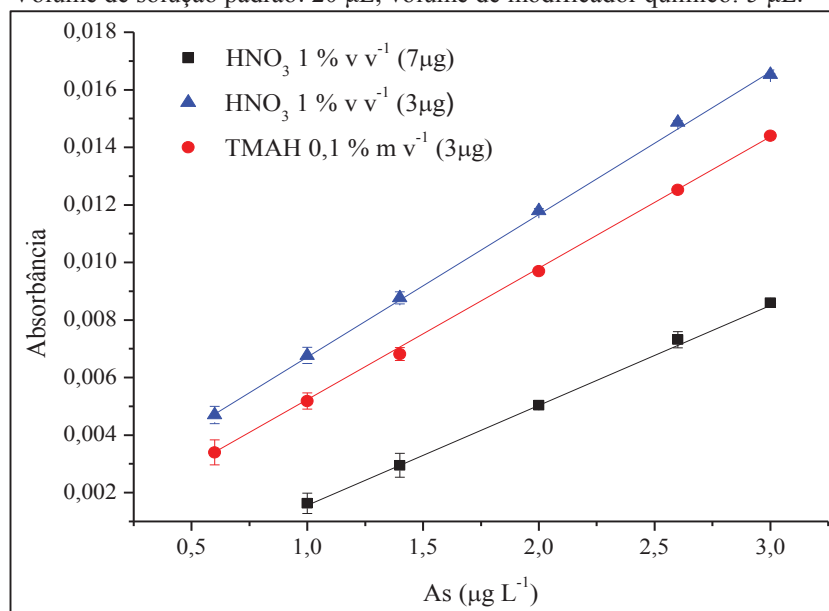


TABELA A1 – Parâmetros das curvas de calibração para As.

	Equação As	y = a + b*x	
		Valor	Erro padrão
TMAH 0,1 % m v ⁻¹	R ² ajustado	0,9990	
	Intercepto	0,0003	9,4636E-04
	Coefficiente angular	0,0047	7,3676E-05
*HNO ₃ 1,0 % v v ⁻¹	R ² ajustado	0,9992	
	Intercepto	0,0018	8,3518E-05
	Coefficiente angular	0,0050	4,2042E-05
**HNO ₃ 1,0 % v v ⁻¹	R ² ajustado	0,9980	
	Intercepto	-0,0020	6,2177E-05
	Coefficiente angular	0,0035	2,9168E-05

*Curva analítica de calibração para As em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ usando 3 μg de modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$; ** Curva analítica de calibração para As em meio de HNO_3 1% v v⁻¹ usando 7 μg de modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$

FIGURA A2 – Gráficos de dispersão dos resíduos (em %) das curvas analíticas de calibração de As em meio de HNO_3 1 % v v^{-1} e em meio de TMAH 0,1% m v^{-1} . Faixa de calibração: 0,6 – 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; modificador químico: 3 μg e 7 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Volume de solução padrão: 20 μL ; volume de modificador químico: 5 μL .

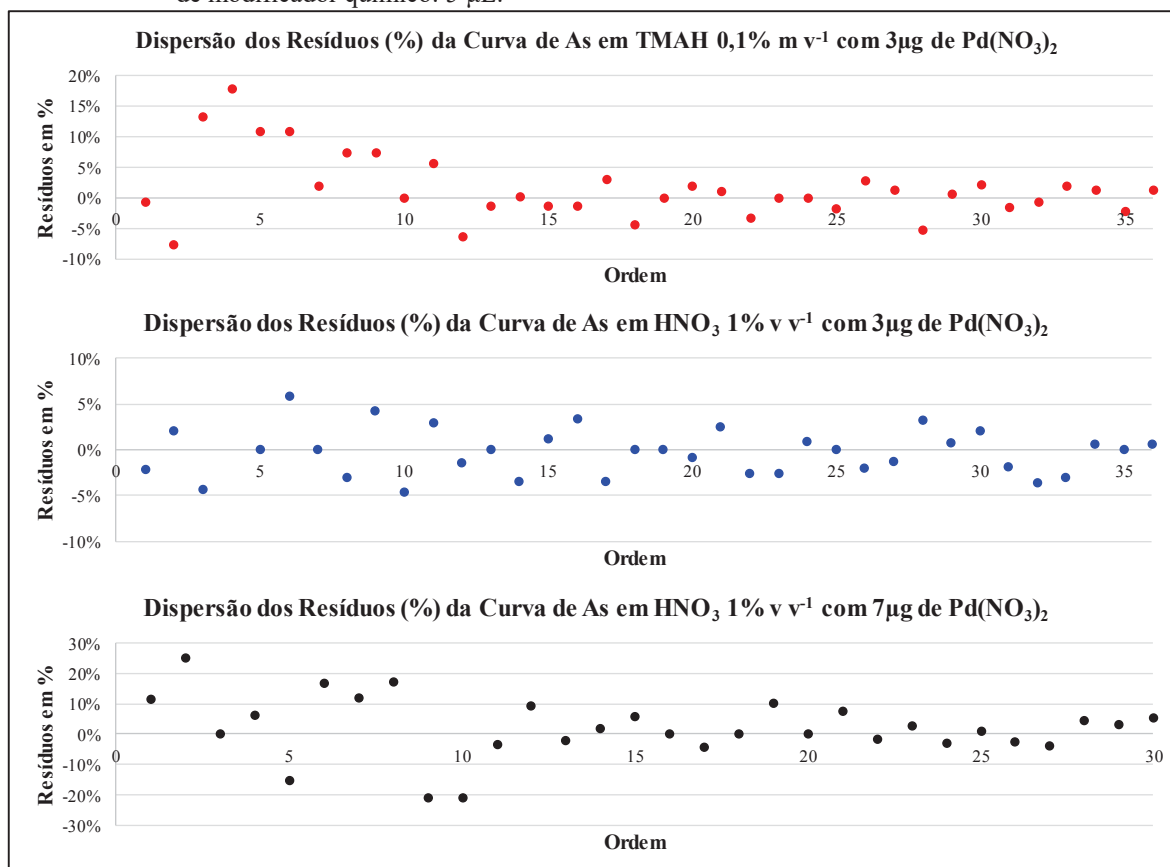


FIGURA A3 – Curvas analíticas de calibração para Cd em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹. Faixa de calibração: 0,05 – 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; modificador químico: 0,5 μg de Pd; volume de solução padrão: 20 μL ; volume de modificador químico: 5 μL .

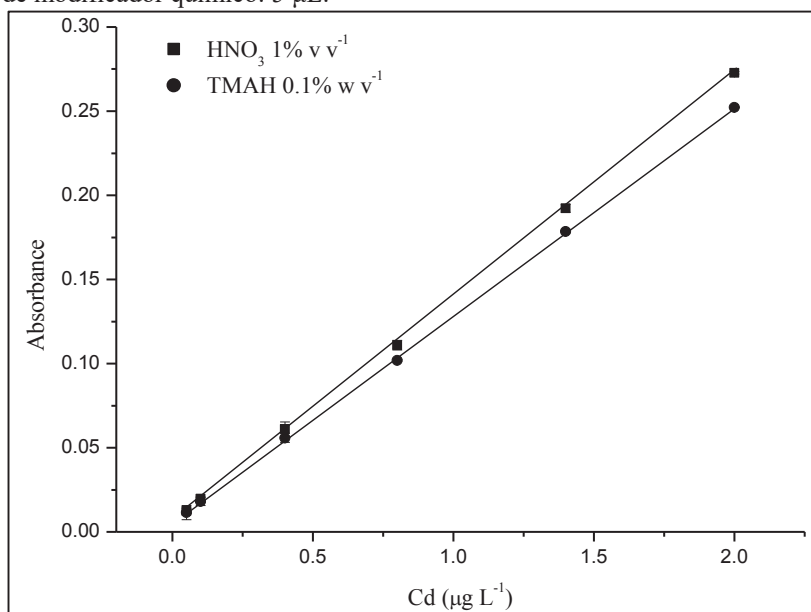


TABELA A2 – Parâmetros da curva de calibração para Cd.

Equação Cd		y = a + b*x	
		Valor	Erro padrão
TMAH 0,1 % m v ⁻¹	R ² ajustado	0,9991	
	Intercepto	0,0053	8,7854E-04
	Coefficiente angular	0,1233	8,1538E-04
HNO ₃ 1 % v v ⁻¹	R ² ajustado	0,9993	
	Intercepto	0,0062	6,5130E-04
	Coefficiente angular	0,1331	6,0447E-04

FIGURA A4 – Gráfico de dispersão dos resíduos (em %) da curva analítica de calibração de Cd em meio de HNO_3 1 % v v⁻¹ e em meio de TMAH 0,1% m v⁻¹. Faixa de calibração: 0,05 – 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; modificador químico: 0,5 μg de Pd; volume de solução padrão: 20 μL ; volume de modificador químico: 5 μL .

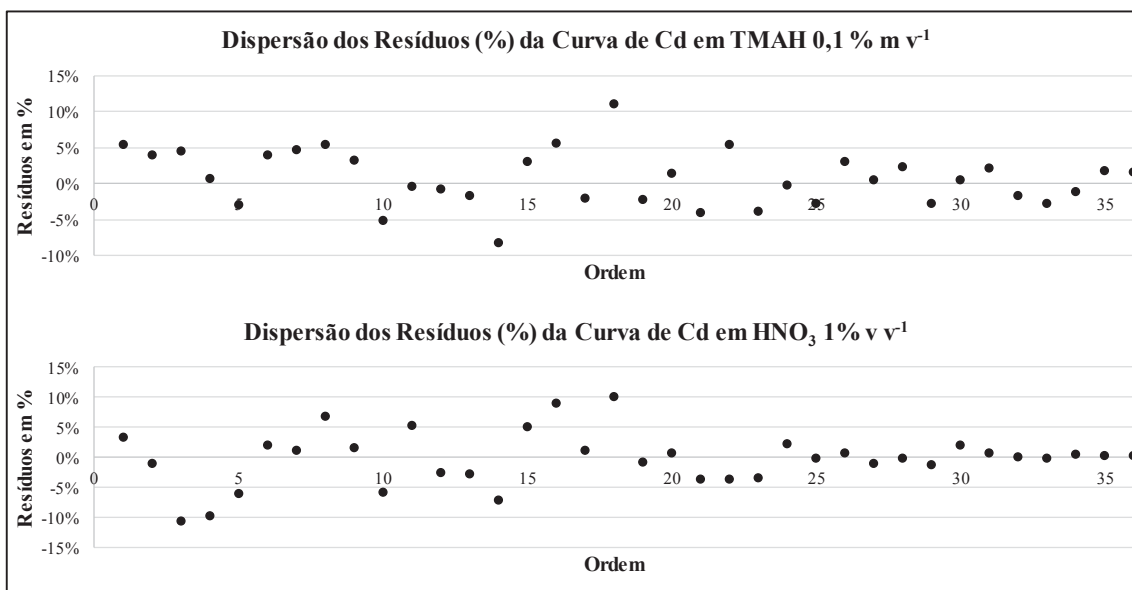


FIGURA A5 – Curvas analíticas de calibração para Pb em meio de HNO₃ 1 % v v⁻¹. Faixa de calibração: 0,4 – 3,00 µg L⁻¹; volume de solução padrão: 20 µL.

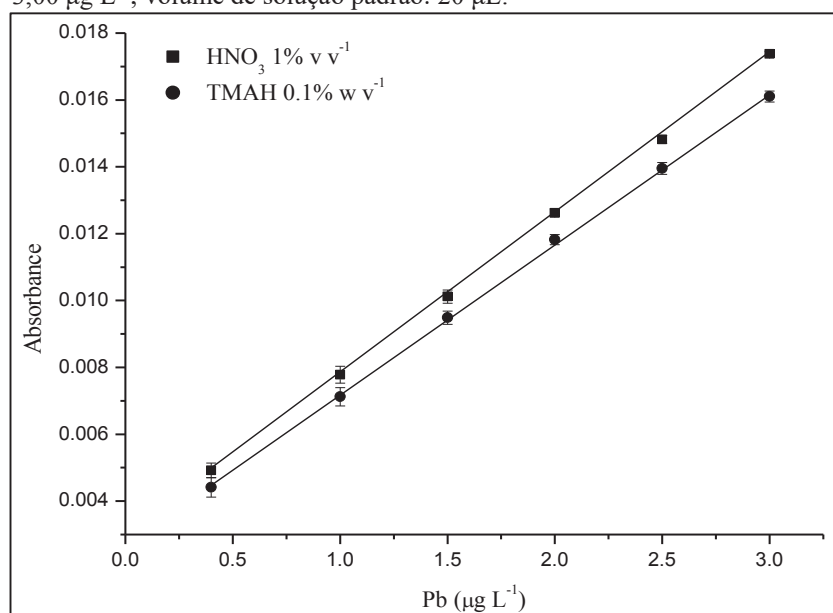


TABELA A3 – Parâmetros da curva de calibração para Pb.

	Equação Pb	y = a + b*x	
		Valor	Erro padrão
TMAH 0,1 % m v ⁻¹	R ² ajustado	0,9987	
	Intercepto	0,0027	1,4217E-04
	Coefficiente angular	0,0045	7,21772E-05
HNO ₃ 1 % v v ⁻¹	R ² ajustado	0,9991	
	Intercepto	0,0030	4,7795E-05
	Coefficiente angular	0,0048	2,4264E-05

FIGURA A6 – Gráfico de dispersão dos resíduos (em %) da curva analítica de calibração de Pb em meio de HNO₃ 1 % v v⁻¹ e em meio de TMAH 0,1% m v⁻¹. Faixa de calibração: 0,4 – 3,0 µg L⁻¹; volume de injeção de amostra: 20 µL.